UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1948 N° 42

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE DANS L'EAU D'ALIMENTATION

(Technique et Utilisation)

THÈSE

Pour le Doctorat en Médecine

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1948

PAR

JEAN RONGAU

MEMBRES DU JURY	MM. ANDRIEU	*Président.*
	P. FABRE	*Assesseurs.*
	VALDIGUIÉ	
	DARNAUD	
	LAPORTE	*Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE MODERNE
22, rue Sainte-Ursule, 22

1948

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548920_0079

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN ..... MM. CALVET
ASSESSEUR ..... LEFEBVRE
Doyens honoraires ..... BARDIER, GORSE

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DALOUS, ESCAT — MM. RISPAL, LAFFORGUE, ARGAUD — MM. MOOG, MERIEL, CAUBET — MM. MAURIN, RIBAUT, SERR

PROFESSEURS

Clinique de neurologie et psychiatrie	MM. RISER
Clinique médicale	TAPIE (J.), ROQUES
Clinique obstétricale	GARIPUY
Physiologie	SOULA
Clinique chirurgicale du cancer	DUCUING
Physique biologique et médicale	BUGNARD
Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques	NANTA
Chimie et Toxicologie	BRUSTIER
Pathologie generale et médecine expérimentale	SENDRAIL
Clinique chirurgicale et gynécologique	LEFEBVRE
Anatomie	VALLOIS, CLERMONT
Histoire naturelle	DELAS
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL R.
Pharmacie	CAUJOLLE
Pathologie interne	MOREL
Bactériologie, hygiène et médecine sociale	ANDRIEU
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	N.
Clinique des Maladies des Voies urinaires	FABRE (P.)
Matière médicale	VINCENT
Hydrologie thérapeutique et Climatologie	MÉRIEL
Anatomie Pathologique	FABRE J.)
Clinique Oto-rhino-laryngologique et Chirurgie Maxillo-faciale	CALVET
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Chimie Biologique	N.
Médecine légale et Médecine du Travail	PLANQUES
Histologie et Embryologie	BROUSSY

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physiologie..... M. BAISSET, Obstétrique..... GUILHEM, Anatomie..... COULOUMA

AGREGES EN EXERCICE

Anatomie	MM. LAZORTHES
Histologie	BIMES ch. f.
Médecine	GADRAT, DARNAUD, GERAUD, DARDENNE, LAPORTE (J.)
Chirurgie	VIRENQUE, GRIMOUD, RIEUNAU, DIEULAFE, DAMBRIN (P.)
Ophtalmologie	DEODATI
Chimie Médicale	VALDIGUIE (P.)
Physique médicale	MARQUES
Pharmacie	COUTURIER
Chimie Générale Pharmaceutique	BLANC
Histoire Naturelle Pharmaceutique	Mme DULUCQ-MATHOU

COURS COMPLEMENTAIRES

Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	MM. GARIPUY
Cours d'anat. physiol. et pathol aux élèves sages-femmes	GUILHEM.
Chimie pathologique	VALDIGUIE (P.)
Chimie biologique	VALDIGUIE (P.)
Chimie minérale	BLANC
Stomatologie	CADENAT
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT
Dermatologie et Syphiligraphie	BAZEX
Législation pharmaceutique	BOUISSET
Microbiologie	BOUISSET
Clinique de la Tuberculose	MOREL L.
Parasitologie	DAMRRIN (P.)
Botanique et Cryptogamie	LASSERRE
Chimie analytique	Mme DULUCQ-MATHOU
Hydrologie et géologie	MM. BLANC
Médecine Sociale et du Travail	ASTRE
Anatomie médico-chirurgicale	BOUNHOURE
Pharmacodynamie	THOMAS
Bactériologie et Hygiène	BONHOURE
Urologie	LAPORTE
Ophtalmologie	LHEZ
Neuro-Chirurgie	DEODATI
Oto-Rhino Laryngol	LAZORTHES
Secrétaire de la Faculté	CLAUX
	DUCROS.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891).

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1948 N° 42

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE DANS L'EAU D'ALIMENTATION

(Technique et Utilisation)

THÈSE

Pour le Doctorat en Médecine

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1948

PAR

JEAN RONGAU

MEMBRES DU JURY	MM. ANDRIEU	*Président.*
	P. FABRE	*Assesseurs.*
	VALDIGUIÉ	
	DARNAUD	
	LAPORTE	*Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE MODERNE
22, rue Sainte-Ursule, 22

1948

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MON PERE

A MA MERE

A MA FEMME

A MES BEAUX PARENTS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE MAITRE
ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

Professeur de Bactériologie
d'Hygiène et de Médecine Sociale

Qui nous a inspiré cette étude. Nous tenons à lui exprimer ici toute notre reconnaissance, non seulement pour l'enseignement et les conseils qu'il nous a prodigué, mais encore pour la bienveillance qu'il nous a toujours manifestée.

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FABRE

Professeur de Clinique Chirurgicale Urologique

En faible témoignage de notre gratitude pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son Service et les connaissances pratiques qu'il nous a permis d'acquérir.

M. LE PROFESSEUR AGREGE VALDIGUIE

Son enseignement théorique et pratique nous a été précieux. Qu'il soit assuré de notre profond et respectueux dévouement.

M. LE PROFESSEUR AGREGE DARNAUD

En témoignage de notre haute considération.

M. LE PROFESSEUR AGREGE LAPORTE

Avec l'assurance de notre respectueux dévouement.

A MADAME LE DOCTEUR ENJALBERT

Médecin-Chef du Laboratoire Villemain

Nous lui sommes profondément reconnaissant de nous avoir, dans cette étude, toujours aimablement aidé de sa précieuse expérience.

A MES MAITRES DE LA FACULTE

ET DES HOPITAUX

A MES CHEFS DE LABORATOIRE

MONSIEUR LE DOCTEUR AVERSENQ

MONSIEUR LE DOCTEUR LEVRAT

MONSIEUR LE DOCTEUR MONNIER

A MES AMIS ET CAMARADES DE FACULTE

INTRODUCTION

Dans le courant de l'année 1947, il a été demandé à plusieurs reprises au Laboratoire de Bactériologie et et d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Toulouse de rechercher le bacille typhique (Salmonella typhi) dans des eaux d'alimentation.

En essayant de mettre au point la meilleure technique à appliquer, nous avons constaté que cette question était très discutée. Les traités classiques, déjà anciens, mentionnent des procédés le plus souvent abandonnés à l'heure actuelle. D'autre part, les livres plus modernes laissent de côté le plus souvent l'étude de ces méthodes.

C'est pourquoi notre maître, M. le Professeur ANDRIEU, nous a conseillé de consacrer ce travail à l'étude du problème de la recherche du bacille typhique dans l'eau d'alimentation.

Cette étude nous a conduit à passer en revue, non seulement les travaux classiques, mais aussi les méthodes récentes dont l'introduction en France, retardée par les

années de guerre, a profondément modifié certaines techniques.

Notre but est double. Nous avons essayé, d'une part, de définir la méthode la plus efficace que nous puissions aujourd'hui utiliser pour rechercher le bacille d'Eberth dans une eau d'alimentation. D'autre part, nous nous sommes efforcés, en tenant compte des opinions les plus couramment admises à l'heure actuelle, de déterminer les limites d'utilisation de la recherche du bacille typhique dans l'eau, et les cas concrets dans lesquels sa mise en œuvre peut être d'une réelle utilité.

Notre plan sera le suivant :

I. — HISTORIQUE.

II. — DÉFINITIONS.

III. — ETUDE DES TECHNIQUES.
- A) *Les différents temps de la recherche.*
- B) *Méthodes proposées.*
- C) *Obstacles rencontrés.*

IV. — ETUDE PRATIQUE D'UNE ÉPIDÉMIE DE FIÈVRE TYPHOIDE.

V. — PLACE DE LA RECHERCHE DU BACILLE D'EBERTH DANS L'EAU, EN BACTÉRIOLOGIE ET EN EPIDÉMIOLOGIE.

HISTORIQUE

L'historique de la recherche du bacille d'Eberth dans l'eau n'est qu'un chapitre de l'étude des maladies infectieuses d'origine hydrique. L'évolution des recherches a conduit, dans ce vaste domaine, à de multiples résultats se rapportant à la clinique, à l'hygiène, à l'épidémiologie et à la bactériologie pure.

L'étude des rapports de l'eau et de la fièvre typhoïde comporte, dans l'ordre chronologique : une ère épidémiologique, une ère bactériologique et enfin une ère d'hygiène. Ces divisions sont un peu arbitraires, car, au fur et à mesure de leur apparition, ces différents centres d'intérêt ne se sont pas séparés d'une façon absolue, mais se sont au contraire aidés en se fournissant de mutuelles impulsions.

Deux faits saillants dans cette évolution : la découverte bactériologique du bacille d'Eberth et, d'autre part, la première utilisation du colibacille comme test

de pollution de l'eau, permettent de délimiter trois grandes périodes.

1. Période épidémiologique antérieure à la découverte du bacille d'Eberth.

2. De la découverte du bacille d'Eberth jusqu'à l'utilisation du colibacille.

3. Période moderne, où l'hygiène joue un rôle sans cesse grandissant, tandis que les techniques bactériologiques se perfectionnent.

1. — Période épidémiologique

Il est d'usage de faire remonter l'origine de la plupart de nos conceptions modernes à des époques très reculées, tant il est vrai que la prescience et l'intuition de nos maîtres de l'Antiquité et du Moyen Age paraissent surprenantes.

Le sujet qui nous occupe se rattache à ce souci millénaire de l'homme, le besoin de l'eau pure. Les sociétés les plus primitives ont empiriquement établi la notion de l'eau malsaine et accordé leurs soins et leur dévotion aux sources bienfaisantes.

De siècles en siècles, dégagées des mystiques, ces constatations revêtirent un aspect de plus en plus scientifique, et le problème de l'origine hydrique des fièvres intestinales se précisera peu à peu.

Au XIX^{e} siècle, les termes prennent lentement la forme à laquelle nous sommes maintenant habitués.

Après la fièvre entéro-mésentérique de PETIT et SERRES, après la Dothienenthérite, puis la Dothienenthérie de BRETTONEAU, LOUIS, en 1829, décrit la fièvre typhoïde telle que nous la connaissons.

Le caractère hautement épidémique de cette affection avait également retenu l'attention des chercheurs. Dès le XVIII[e] siècle, certains, comme DEHORME, avaient entrevu le rôle de l'eau dans la transmission de ces fièvres continues. Dans le courant du siècle suivant, cette conception, appliquée à la fièvre typhoïde se renforce et se précise.

Des travaux d'ordre purement épidémiologique, des observations empiriques s'accumulent. (HOEGLER, THOME et BOURNIC). En France, BROUARDEL et CHANTEMESSE et WIDAL affirment d'une façon presque absolue l'origine aqueuse des épidémies de fièvre typhoïde.

Cette première période se termine donc sur une acquisition précise : celle du plus important des agents vecteurs de la fièvre typhoïde, l'eau. Aucune preuve expérimentale ne pouvait être apportée à l'appui de cette théorie, tant que l'on n'avait pas connaissance de l'agent causal.

2. — Période bactériologique antérieure au test-Coli

En 1880, Eberth met en évidence le bacille qui porte désormais son nom. L'année suivante, GAFFKY en précise les caractères. Presque immédiatement, les chercheurs s'efforcent de retrouver les bacilles typhoïdi-

ques dans les produits pathologiques d'abord, puis dans les produits souillés.

De nombreux bactériologistes les recherchent également dans l'eau et pendant quelques années, les communications vont s'accumuler.

Le premier, en 1885, MŒRS isole un bacille typhoïdique dans l'eau d'une ferme du village de Lisbourg. Presque en même temps, YVAN MICHAEL, à Dresden, CHANTEMESSE, BROUARDEL et WIDAL, successivement dans l'eau d'un puits de Pierrefonds, dans un réservoir à Clermont-Ferrand et dans l'eau d'une borne-fontaine de Ménilmontant, retrouvent des bacilles typhiques (1886-1887) (10-15).

Désormais, on isole le bacille d'Eberth de l'eau suspecte au cours de la plupart des nombreuses épidémies de fièvre typhoïde qui se succèdent à cette époque.

Tour à tour, de 1887 à 1891, THOINOT, à Paris, LOIR, dans l'eau même de l'Institut Pasteur, VAUGHAM et NOVY à Michigan, PETRESCO à Budapest, VAILLARD en plusieurs occasions, BARDACH à Odessa, ROUX à Quimper, VINCENT et MIQUEL dans l'eau de la Seine, ainsi que PERE à Alger, réalisent avec succès cette recherche (10-15-80).

Malgré cette abondance de résultats positifs, certains chercheurs éprouvent des doutes qui les obligent à reconsidérer le problème. Ainsi ROUX, THOINOT et CHANTEMESSE (1900-1902) (10-15-80) dégagent des conclusions qui peuvent ainsi se résumer.

Il existe de nombreux bacilles qui simulent le bacille typhique. Ainsi les nombreux pseudo-bacilles typhoïdiques de CASSEDEBAT (13) et surtout le colibacille (1885), qui semble pulluler dans les produits souillés et en particulier dans l'eau. On ne peut donc pas affirmer que tous les germes isolés de l'eau comme bacille d'Eberth l'étaient effectivement. Au contraire, il semble qu'il s'agissait dans la plupart des cas de colibacilles.

Pour bien comprendre ces doutes, il faut se rappeler que si pour nous la plus simple des galeries d'identification semble le minimum exigible, les premiers bactériologistes ne disposaient pour reconnaître un germe que de l'examen morphologique direct et de l'aspect des colonies sur les milieux de culture très simples. La caractérisation biochimique était encore très mal connue. D'autre part, les premiers bouillons de culture estimés sélectifs s'avérèrent assez rapidement aussi favorables à la pousse du colibacille qu'à celle du bacille d'Eberth.

C'est pourquoi les auteurs que nous avons cités, affirment non seulement la nécessité d'une identification plus poussée, mais aussi l'utilisation de milieux qui permettraient d'isoler le bacille d'Eberth en le séparant du colibacille.

Ils s'opposent cependant au septicisme poussé au maximum de certains chercheurs qui doutent de l'existence possible du bacille d'Eberth dans l'eau. En effet, les preuves épidémiologiques sont très fortes et d'autre part, certains des isolements réalisés peuvent être considérés comme valables.

De cette attitude, il restera cependant une certaine méfiance vis-à-vis de la réalité des premiers résultats positifs signalés, c'est ainsi que certains auteurs modernes n'admettent comme première référence valable que l'isolement réalisé dix ans après le début des recherches par LŒSENER (1895). Cet auteur signalait l'isolement à l'état pur d'un bacille typhoïdique dans l'eau d'une conduite de Berlin.

En 1900, des problèmes complexes se posent donc aux bactériologistes. En effet, l'hygiéniste intervient dans le débat et veut impérieusement savoir quelle est la qualité de telle ou telle eau et connaître d'autre part son rôle exact dans le déroulement d'une épidémie donnée.

Jusqu'à cette période, la réponse à ces questions était faite par le chimiste qui dosait l'oxygène ou les matières organiques contenues dans l'eau. Or, la microbiologie vient de conquérir sa place dans le cadre de l'examen de l'eau et elle doit la conserver. Parler de conquête n'est pas exagéré, car certaines polémiques entre chimistes et biologistes prennent à cette époque le ton de discussion passionnée.

Pour que la recherche bactériologique soit à même de remplir le rôle qu'on veut lui faire jouer, les bactériologistes se demandent alors comment conduire l'examen. Faut-il compter tous les germes existant dans un volume donné d'eau ou bien rechercher uniquement les espèces pathogènes ou enfin déterminer toutes les espèces microbiennes présentes.

L'identification de toutes les espèces bactériennes vivant dans l'eau est un travail trop difficile et trop complexe pour pouvoir servir de moyen de contrôle. Cette recherche fera simplement s'allonger d'année en année la liste déjà longue des bactéries hydriques.

Par contre, la numération des germes donne de bons résultats et son principe a été conservé encore de nos jours dans une partie de l'analyse bactériologique de l'eau.

Quant aux espèces pathogènes, à l'époque qui nous occupe, le bacille typhoïdique et les bacilles paratyphoïdiques, les bacilles dyssentériques et les vibrions cholériques retiennent surtout l'intérêt. Mais, la mise au point des méthodes d'isolement et d'identification nécessitait encore de multiples recherches.

Dans de telles conditions, les bactériologistes devaient être amenés à chercher un moyen de surmonter toutes ces difficultés en utilisant une technique à la fois plus simple et plus sûre.

3. — Période moderne

C'est dans cet état d'esprit que VINCENT, en 1905, expose la « Signification du colibacille dans l'eau ». L'utilisation du colibacille comme test de pollution de l'eau, bien qu'attirant a priori l'attention des bactériologistes, ne pouvait pas cependant être d'emblée totale.

Il fallait en effet mettre au point la technique et l'interprétation de ce test.

Pendant toute cette période d'attente, la recherche des germes pathogènes garde son intérêt et plus spécialement celle des bacilles typhiques et para-typhiques demeure une des parts importantes de l'examen bactériologique poussé d'une eau. Sa technique bénéficie des progrès faits en matière de procédés généraux d'isolement du bacille d'Eberth dans les produits pathologiques.

Pourtant, si la complication technique va croissant, le nombre des résultats positifs est loin de suivre la même progression car le contrôle à l'identification devient de plus en plus rigoureux. Parallèlement, le test Coli (nous utiliserons cet abrégé couramment employé à l'heure actuelle) se perfectionne, son interprétation devient plus aisée, ses partisans plus nombreux, au point que certains bactériologistes le considèrent comme le seul moyen d'examiner bactériologiquement une eau. Ainsi, ROSENAU (78) écrit en 1918 : « Chercher un bacille typhique dans l'eau, c'est chercher une aiguille dans une botte de foin. » Cette conclusion, qui est plutôt une boutade paraît un peu hâtive, car la question est loin d'être jugée.

En effet, le test Coli est assez violemment discuté. On trouve, dans certaines eaux, assez peu de colibacilles, mais par contre on y met en évidence des germes pathogènes. D'autre part, aux colibacilles d'origine fécale, on oppose les colibacilles d'origine ubiquitaire, de récente découverte. On pense alors qu'il convient encore de perfectionner le test Coli, et du même coup, la recher-

che du bacille d'Eberth reprend de son intérêt. Il en sera ainsi pendant de nombreuses années, depuis 1920. Chaque échec du test Coli renforcera l'importance du bacille d'Eberth. Ceci explique que de nombreux travaux aient été consacrés jusqu'à ces dernières années à la mise au point d'une technique de recherche du bacille typhoïdique dans l'eau.

La simple énumération de ces nombreuses communications et articles serait d'un intérêt limité.

Un certain nombre d'entre eux est consacré à l'exposé de quelques méthodes nouvelles d'enrichissement ou d'isolement et nous aurons l'occasion de les citer et de les examiner en étudiant les techniques.

D'autres se bornent à indiquer des isolements réalisés au cours de certaines épidémies en utilisant un procédé déjà connu. Ils présentent surtout un intérêt statistique. Nous avons trouvé des références de ce genre dans des articles de WEINBERG (107), RÉMY (72) et dans les traités de Bactériologie des eaux.

Dans cet historique, nous nous intéresserons surtout à quelques travaux qui, par leur ampleur ou par leur nouveauté, ont véritablement rapporté des éléments nouveaux au problème qui nous occupe.

En France, un des plus gros efforts systématiques a été accompli par DIENERT et GUILLERD (29-33). D'autres bactériologistes se sont également intéressés à la question, ainsi DUJARRIC de la RIVIÈRE et CHU.

Dans les pays anglo-saxons, l'application à l'examen bactériologique de l'eau du milieu de WILSON et BLAIR (1927) a provoqué la réalisation de travaux d'une ampleur remarquable.

De 1927 à 1938, chaque rapport annuel du London Métropolitan Water Board Laboratory comporte des références et des statistiques concernant l'isolement des bactéries pathogènes (61). Ces recherches ont été effectuées sous l'impulsion, au début, de Sir Alexander HOUSTON (41), dans l'eau de la Tamise, et dans les égouts de Londres.

Une partie des expériences a été contrôlée en ajoutant une concentration connue de bacille d'Eberth à la moitié de l'échantillon et en exprimant la concentration de bacilles typhiques présents dans l'eau par l'expression :

$$\frac{\text{Quantité de bacilles typhiques ajoutés.}}{\text{Quantités de bacilles typhiques retrouvés.}}$$

C'est dire avec quel soin les investigations ont été conduites. De 1931 à 1938, ce même laboratoire a également recherché les bacilles para-typhiques B, en particulier au cours d'épidémies en 1931, 1933 et 1935 à Epping.

A ce travail de base, s'ajoutent quelques recherches d'une portée plus réduite, ainsi les isolements de WILSON et BLAIR, en Angleterre (1928) (108-109), de STEWART et GHOSAL (93) aux Indes, de MOM et de

SHAEFFER dans les Indes Néerlandaises et les travaux hollandais de RUYS (82) et de VAN LONGHEM (101).

On peut ajouter à ces travaux quelques recherches effectuées par des chercheurs isolés dans différents pays. (3, 38, 70, 71, 96).

Nous ne mentionnerons pas ici les travaux et les opinions les plus récentes, nous réservant d'étudier plus tard le point de vue actuel des bactériologistes sur le problème de la place à donner à la recherche du bacille typhique.

Avant d'aborder la partie plus technique des méthodes bactériologiques, nous devons préciser les limites exactes de cette étude et définir, parmi les autres bactéries pathogènes intestinales, le germe qui nous intéresse.

DEFINITIONS

Nous aurions pu, dans ce travail, envisager la recherche complète des bactéries intestinales pathogènes dans l'eau d'alimentation. Cette étude aurait alors comporté la recherche des Salmonella en général et en particulier celle des bacilles typhiques et paratyphiques, la recherche des bacilles dyssentériques et la recherche des colibacilles.

Mais, il s'agit là, en réalité, de problèmes d'un intérêt très différent.

La recherche du colibacille dans l'eau a une valeur de test absolument distincte de celle des germes pathogènes ; elle nécessite d'autre part une technique particulière qui est, à l'heure actuelle, d'emploi très courant.

La recherche des Schigella dans l'eau, quoique comparable au point de vue technique à celle des Salmonella, a cependant une importance moindre du point de vue de l'hygiène et de l'épidémiologie. Cette recherche exige d'autre part la mise en œuvre de procédés spé-

ciaux et l'utilisation de milieux spécifiques des bacilles dyssentériques.

Nous avons donc limité ce travail à l'étude des Salmonella dans l'eau. Parmi ces Salmonella, le bacille typhique et les bacilles paratyphiques A et B occupent une place prépondérante. Ce sont en effet les germes de ce groupe qui sont le plus souvent retrouvés chez l'homme et dont le pouvoir pathogène est le plus élevé.

L'importance clinique, épidémiologique et hygiénique des fièvres typhoïdes, maladies à déclaration obligatoire N° 1, n'est plus à démontrer. Notre centre d'intérêt sera donc le bacille d'Eberth et les bacilles para-typhiques A et B.

La définition de ces germes, dont les propriétés bactériologiques sont maintenant bien connues, est aisée. Il est plus difficile, par contre, de les classer, car le groupe dont ils font partie, les Salmonella, n'a cessé de s'accroître en nombre et en importance au cours de ces dernières années.

On décrit à l'heure actuelle environ 150 Salmonella qui répondent toutes à cette définition d'ensemble.

« Bacilles Gram négatifs, sans capsule, mobiles, atta-
« quant régulièrement le glucose avec ou sans produc-
« tion de gaz, n'attaquant ni le lactose, ni le saccharose,
« ne coagulant pas le lait, ne liquéfiant pas la gélatine,
« ne produisant, en règle générale, pas d'indol. »

Pour ordonner ces germes trois classifications sont actuellement en usage.

a) BERGEY (5) conserve aux bacilles typhiques et para-typhiques une place à part en les distinguant, sous le terme d'Eberthella, des autres Salmonella. Dans l'intérieur de ces groupes, les germes sont définis par leurs propriétés morphologiques et biochimiques principales.

b) La récente classification américaine de 1944 (9) est également basée sur la biochimie. Mais tous les bacilles sont réunis sous le terme de Salmonella, et groupés selon leur comportement sur milieux à l'inositol.

c) La systématique de KAUFFMANN et WHITE (48) repose uniquement sur les caractères sérologiques des Salmonella. Elle est le résultat de nombreux travaux sur les antigènes de groupes et les antigènes spécifiques, qui sont encore poursuivis à l'heure actuelle.

Les bacilles typhiques et para-typhiques répondent à la définition de base des Salmonella. Les autres propriétés qui permettent de les identifier peuvent être ainsi schématisées selon les diverses classifications.

CLASSIFICATIONS		SALM. TYPHI.	SALM. PARATYPHI A	SALM. PARATYPHI B.
Bergey	Glucose	+ sans gaz	+ (qq. bulles de gaz	+ (avec gaz)
	Xylose	+	— (le plus souvent)	action inconstante
	Rouge neutre	—	+ (légèrement)	+
	H_2S	+	—	+
Kauffmann et White	N°	52	1	2
	Formule antigénique	O . IX . XII — Vi — H. d. j	O (I) . II . XII — H. a.	O . (I) . IV . (V.) XII. H b. 1,2
Class. américaine	N°	118	104	122
	Groupe	III inositol nég.	III inositol nég.	IV inositol variable
	Sous groupes	H = Glucose + Tréhalose + } sans gaz	C Glucose + Dulcite + Arabinose + Tréhalose + } avec gaz 1° Xylose neg.	B Glucose + Dulcite + Arabinose + Tréhalose + Xylose + } avec gaz

Milieu Sucrés + : acidification — sans action.
Milieu au Rouge neutre + : réduction — sans action.

ETUDE DES TECHNIQUES

I. — LES DIFFERENTS TEMPS DE LA TECHNIQUE

La recherche du bacille d'Eberth dans l'eau présente un certain nombre de difficultés particulières. En effet, les bactéries pathogènes sont en général peu abondantes dans l'eau.

Pour parvenir à les mettre en évidence il faut augmenter le nombre de ces bacilles dans la quantité d'eau dont on dispose. C'est là le but de l'enrichissement.

Ceci réalisé, on repique les germes sur un milieu solide pour obtenir des colonies séparées : c'est l'isolement.

Enfin ces colonies seront prélevées pour la mise en évidence des propriétés du germe. C'est l'identification.

Ces trois points, enrichissement, isolement et identification nécessitent des techniques bien distinctes.

Pour chacune d'elles, de nombreux procédés ont été proposés ; ceux qui sont encore en usage retiendront particulièrement notre attention. Nous examinerons donc successivement :

A. Méthodes d'enrichissement.

B. Méthodes d'isolement.

C. Méthodes d'identification.

A) METHODES D'ENRICHISSEMENT

La concentration en germes de l'eau peut être représentée par une fraction :

$$\frac{\text{Quantité de germes}}{\text{Volume de l'échantillon d'eau}}$$

Le but de l'enrichissement est d'augmenter le pourcentage que cette fraction exprime. Deux solutions mathématiques sont possibles : Diminuer le dénominateur, ou faire croître le numérateur.

1. - Diminuer le dénominateur revient à éliminer le plus possible l'eau pour ne conserver que les germes qu'elle contient : autrement dit, à concentrer la suspension microbienne dans son support aqueux.

Un premier groupe de procédés que nous appellerons méthodes de concentration utilise ce principe suivant deux techniques différentes.

a) Dans la première, on conserve tous les germes existant dans l'eau ; c'est ce que réalisent l'évaporation, la filtration et la précipitation, procédés non spécifiques.

b) Dans la seconde, on s'efforce d'éliminer en même temps l'eau et les bactéries autres que le bacille d'Eberth. On s'adressera alors à des procédés spécifiques (Absorption, mobilité, agglutination).

2. - Pour augmenter le numérateur de la fraction que nous avons définie, il faut faire croître le nombre des microbes. Cette multiplication est réalisée en bactériologie par la mise en culture qui permettra la multiplication des bactéries contenues dans l'eau.

Pour passer en revue chacun de ces procédés, nous étudierons successivement :

1. - Procédés de concentration.

a) Méthodes non spécifiques.

b) Méthodes spécifiques.

2. - Procédés de culture.

1. Procédés de concentration

a) Méthodes non spécifiques

1) *Evaporation.*

Quand on veut concentrer un corps chimique contenu en solution, le plus simple est d'évaporer le solvant.

Les premiers bactériologistes ont tenté sans succès la recherche morphologique des germes dans une

goutte d'eau, sous le microscope, en évaporant cette goutte et en la colorant.

Cet examen direct ne donnant aucun résultat, on a recourt à l'ensemencement résultant de l'évaporation de quelques gouttes d'eau (MARMANN et SCHURMANN).

Lorsqu'on a constaté la faible teneur de l'eau en bacilles typhiques, la nécessité s'est imposée d'évaporer des quantités plus importantes d'eau à examiner.

Le plus grand effort dans ce domaine est réalisé sans doute par FAUST et HEIM, qui poussent le soin jusqu'à faire construire un appareil spécial évaporant l'eau sous courant d'air chaud et permettant d'autre part l'obtention d'un dépôt facile à utiliser.

Pourtant, il ne reste rien aujourd'hui de ces tentatives, car le procédé présente de gros inconvénients : Nécessité d'une installation spéciale, manque de commodité, difficulté de récupération du dépôt.

D'autre part, ces techniques d'évaporation sont loin d'être sans action traumatisante sur les germes.

2) *Filtration.*

Le procédé classique d'épuration de l'eau par filtration laisse un dépôt microbien que certains bactériologistes ont cherché à utiliser.

Les premières tentatives furent effectuées par LOIR et aussi par CHANTEMESSE (15). Ils font passer une grande quantité d'eau à travers une bougie Chamber-

land fine, recueillent le dépôt soit au pinceau, soit par un jet d'eau stérile ou d'eau peptonée, et l'ensemencent. HESSU complique et affine la technique en traitant au préalable la bougie par de l'eau stérile contenant en suspension de la terre d'infusoire.

Plus récemment, WEINBERG et ses collaborateurs (107) nous offrent une adaptation simple et pratique du principe de la filtration, procédé qu'ils appuient d'une expérimentation poussée.

On utilise un récipient cylindrique en verre de 750 à 1.000 cc. ouvert aux deux extrémités et muni à sa partie inférieure d'un étranglement et d'un robinet. On tasse dans le fond du cylindre, de bas en haut, une couche d'ouate hydrophile, une couche de perles de verre, une épaisseur de papier filtre, une couche formée de 3 à 5 grammes de terre d'infusoire desséchée et pulvérisée au mortier et enfin une nouvelle épaisseur de papier filtre. Tout ceci constitue l'élément filtrant. On ferme le robinet, on bouche l'orifice supérieur au coton et on stérilise l'appareil ainsi préparé à la chaleur sèche.

Pour l'emploi, l'appareil étant vertical sur un support, on ouvre le robinet inférieur et on fait passer à travers le filtre la quantité d'eau suspecte dont on dispose (1 à 2 litres en moyenne). Quand la filtration est terminée, on ferme le robinet et on introduit dans le récipient 100 à 200 cc de milieux de culture d'enrichissement (les auteurs ont utilisé le milieu de KAUFFMANN). On agite et on met à l'étuve.

Des nombreuses expériences sur des eaux suspectes et sur des eaux artificiellement souillées par du bacille typhique à des concentrations diverses fixent la limite inférieure de sensibilité de cette technique à une concentration de 22 bacilles par litre.

Une autre suggestion intéressante nous vient d'Italie où un certain nombre de bactériologistes comme CICARELLI (N° 18) et ZEETI, nous font part de bons résultats obtenus en remplaçant les filtres habituels par des membranes ultra-filtrantes de collodion.

Il est prématuré d'assigner à ces méthodes une valeur absolue avant de pouvoir les comparer à d'autres. Mais nous voyons déjà qu'elles sont simples et évitent de traumatiser les bacilles. La technique de Weinberg offre cet avantage important de supprimer toute manipulation, le dépôt étant intégralement mis en culture. L'objection majeure qui leur a été faite est un manque de sensibilité, les filtres laissant échapper quelques bacilles, surtout lorsqu'ils sont en faible nombre. L'utilisation d'une membrane au collodion augmente le pouvoir d'arrêt de l'appareil de filtration.

3) *Précipitation.*

Sous ce titre, se groupent des techniques utilisant un précipité colloïdal. Leur principe, appliqué également à la clarification de l'eau, revient à faire traverser l'eau par un nuage de fines particules qui dans leur chute entraîneront avec elles les bactéries, accélérant ainsi la sédimentation normale. Cette action mécanique se

double d'un phénomène électrique, la charge électrique des particules colloïdales jouant un rôle important. En effet, l'expérience montre que les gels d'hydroxydes métalliques dont les granules sont chargées positivement donnent les meilleurs résultats en entraînant les bactéries par fixation sur leurs particules.

Pour obtenir ces gels, on utilise surtout trois métaux: le fer, le plomb et l'aluminium. De nombreuses techniques ont été proposées.

MULLER (66) ajoute directement à trois litres d'eau, 5 cc. d'oxychlorure ferreux et reprend le dépôt après décantation.

FICKER et HOFFMANN (29) ont aussi recours à la formation d'hydroxyde ferreux, Fe (OH) 2, mais en mélangeant à l'eau suspecte 7 cc. d'une solution à 10 % de sulfate ferreux et 8 cc d'une solution à 10 % de soude. Le dépôt est repris par centrifugation et le culot qui en résulte dissous dans son demi-volume de tartrate neutre de K. à 25 %.

VALLET (101) utilise l'hydroxyde, Pb (OH) 2. Il l'obtient en ajoutant à 20 cc. d'eau à examiner IV Gouttes de solution aqueuse saturée d'hyposulfite de soude et IV Gouttes de solution saturée de nitrate de plomb. Comme dans la technique précédente, le dépôt est centrifugé, le culot dissous dans un excès d'hyposulfite de soude.

SCHUDER (87) applique à deux litres d'eau la technique préconisée par VALLET.

On utilise enfin l'hydroxyde d'alumine, ou alumine gélatineuse dans les mêmes conditions que les hydroxydes de plomb ou de fer. Mais l'expérience ayant montré que ce gel d'alumine est plus efficace que les autres, probablement parce que plus divisé, nous envisagerons d'une façon plus précise son emploi.

Pour obtenir l'hydroxyde d'alumine, on peut ajouter à l'eau une solution d'alun (sel double d'aluminium et de K.) ou de sulfate d'alumine, et laisser l'hydrolyse spontanée se faire. (Technique de WILSON). Cependant, il est préférable d'accélérer la production d'Al (OH)3 par l'addition d'une base. Ainsi SUCKLING (97) nous conseille d'ajouter à un litre d'eau 10 à 50 milligrammes de sulfate d'alumine et 10 à 50 milligrammes de chaux précipitée.

En substituant l'amonniaque à la chaux, il sera plus facile d'obtenir un précipité abondant et divisé d'hydroxyde d'alumine. Cette opération doit s'effectuer en dehors de l'eau à examiner, la présence de l'ammoniaqu pouvant être nuisible pour les microbes qu'elle contient. La préparation de l'alumine gélatineuse fera donc l'objet d'un premier temps bien distinct.

DIENERT et GUILLERD (21 et 33) ont en France le mérite d'avoir mis au point cette méthode et de l'avoir soigneusement expérimentée. Son utilisation a permis également à STEWART et GHOSAL (93) d'obtenir de bons résultats. Ils conseillent cependant quand on opère sur une eau alcaline d'ajouter 1 % d'acide phosphori-

que avant de faire agir l'alumine, pour éviter une redissolution du précipité.

Nous avons employé la technique suivante très voisine de celle de DIENERT et GUILLERD. Son exécution comporte deux opérations successives. Préparation du gel d'alumine, exécution de l'enrichissement.

a) Préparation de l'alumine.

Dans le laboratoire de chimie biologique de notre maître, Monsieur le Professeur VALDIGUIÉ, l'hydroxyde d'alumine B que nous avons utilisé, a été préparé de la façon suivante :

Une solution de 100 grammes de sulfate d'alumine $(SO_4)_3\ Al_2,\ 18\ OH_2$ dans 300 cc. d'eau est portée en une seule fois et sous vive agitation mécanique (agitateur vertical à mouvement excentrique) dans 1 litre d'ammoniaque à 20 % chauffé à 50° dans un vase émaillé.

Maintenir à 70°. Agiter 30', refroidir et laisser reposer. Décanter et laver trois fois à l'eau.

Ajouter 800 cc. d'ammoniaque à 20 %. Chauffer une demi-heure à 60° sous vive agitation. Laisser refroidir, et filtrer sur trompe à vide.

Laver le précipité en goutte à goutte puis abondamment à l'eau jusqu'à disparition de toute trace d'ammoniaque, ce que l'on vérifiera par le réactif de Nessler.

Agiter le précipité avec de l'eau distillée et répartir le lait ainsi obtenu et qui doit être assez consistant par 20 cc. dans des tubes. Stériliser 15' à 110°. Sous cette forme, l'alumine gélatineuse se conserve bien.

b) Exécution.

L'eau à analyser (de 1 à 2 litres) est mise dans un ballon stérile à fond plat. On ajoute une quantité suffisante de gel d'alumine (en moyenne 20 cc. de la suspension préparée, soit un tube, par litre d'eau). On mélange rapidement par une vive rotation jusqu'à ce que la masse soit devenue d'une opalescence homogène.

Mettre le ballon à la glacière et laisser déposer 5 à 10 heures pour obtenir une bonne décantation.

Avec un tube de verre que l'on recourbera en demi-cercle à sa partie inférieure et un tube de caoutchouc, on fabrique un siphon qui permet de décanter le liquide surnageant qui doit être parfaitement limpide. Il ne faut pas enlever le mélange d'eau et d'alumine qui surmonte le dépôt sous l'aspect d'une couche blanchâtre contenant de nombreux bacilles.

Cette couche sera recueillie avec soin, ainsi que le précipité, et soumise à la centrifugation. (Prévoir un tube de 10 cc. environ par 100 cc. d'eau traitée). Après centrifugation, on décante facilement le liquide surnageant dans le tube car les culots adhèrent bien au fond. Ces culots seront repris par quelques cc. d'eau distillée ou d'eau peptonée stérile et ensemencés.

Tous les bactériologistes qui ont utilisé cette méthode s'accordent à reconnaître son efficacité.

Son inconvénient majeur est le risque de souillure pendant la centrifugation, risque d'autant plus grand que la quantité d'eau traitée est plus importante.

Pour éviter ces manipulations dangereuses, on peut ajouter dans le ballon, après siphonnage de l'eau clarifiée, une quantité appropriée de milieux concentrés enrichissants (Sélénite, Kauffmann) et mettre le tout directement à l'étuve.

D'ailleurs, l'utilisation d'un milieu enrichissant sélectif est toujours nécessaire après les procédés que nous venons d'étudier.

En effet, toutes ces techniques nous permettent d'éliminer l'eau et de ne conserver que les germes qu'elle contient. Mais, cet amas de germes comprend éventuellement des bactéries pathogènes et surtout un très grand nombre de bacilles saprophytes banaux ou d'origine intestinale.

b) Méthodes spécifiques

Dans ce groupe de techniques on utilise certaines propriétés biologiques du bacille d'Eberth pour le séparer en même temps de l'eau et des autres germes qu'elle contient.

Un des plus anciens procédés est celui proposé par RODET et par VINCENT (103). La résistance à la chaleur du bacille typhique étant supérieure à celle des

autres bactéries, on pouvait espérer les séparer en portant l'eau à une température de 45° à 45°5. Mais à cette température le colibacille garde toute sa vitalité, ce qui ôte tout intérêt à la méthode.

KUHN et EISENBERG préconisent l'utilisation du noir animal. Selon ces auteurs, le noir animal adsorberait plus facilement le bacille d'Eberth que les autres bactéries présentes dans l'eau. En réalité, cette propriété n'a permis la réalisation d'aucune méthode pratique.

D'autres auteurs se servent de la plus grande mobilité du bacille typhoïdique, qui traverse plus rapidement que les autres bactéries intestinales les éléments filtrants. Ce phénomène est mis en évidence par CAMBIER, qui utilise une bougie filtrante, et surout par CARNOT et WEILL-HALLE avec un tube en U garni de sable. A l'aide de ce tube, il est possible de réaliser une expérience de laboratoire pleinement démonstrative, mais nous n'avons pu noter aucune application de son principe à des méthodes pratiques.

WINDELBRANT, HAGEMANN, BELONOVSKY (4) et CHANTEMESSE (15) tentent, par l'emploi des phénomènes d'agglutination spécifiques, l'isolement du bacille typhique en ajoutant à l'eau suspecte filtrée sommairement du sérum agglutinant le bacille d'Eberth à un taux élevé (86).

Les proportions de sérum ajouté varient légèrement selon les auteurs. Si le bacille typhique est présent

dans l'eau, les agglutinats du germe tombent au fond du ballon.

Pour faciliter le recueil de ces amas de bacilles, toujours peu abondants, ALTSCHULLER (1) fait le mélange eau-sérum, dans une sorte de burette munie à son extrémité inférieure d'un robinet. Le précipité s'amasserait au fond du récipient et, en ouvrant le robinet, il serait possible de le faire passer directement dans le milieu de culture.

Cette technique, expérimentée avec de l'eau souillée artificiellement par un bacille typhique provenant d'une souche de laboratoire, donne d'excellents résultats. Par contre, REMY, LOMAKINE, HIRSBUCH ont les premiers exprimé des doutes sur les possibilités d'agglutiner des bacilles qui ont séjourné plus ou moins longtemps dans un milieu peu favorable tel que l'eau.

Cette crainte s'est trouvée justifiée et l'on pense à l'heure actuelle que le bacille typhique perd pendant son séjour dans l'eau une grande partie de sa sensibilité aux agglutinines. Après isolement, une culture de 24 heures sur un milieu favorable est souvent nécessaire pour que le germe retrouve toutes ses propriétés spécifiques d'agglutination.

Cette difficulté, ajoutée à la trop faible quantité de bacilles typhiques contenus dans l'eau, enlève donc beaucoup d'efficacité aux méthodes basées sur l'agglutination.

2. Procédés de culture

Dans ce groupe de méthodes, on utilise des milieux de culture. Ces milieux de culture doivent être liquides et suffisamment riches pour que les germes puissent s'y multiplier abondamment.

Mais le nombre de bacilles d'Eberth contenus dans un volume donné d'eau polluée est très petit par rapport à celui des bactéries saprophytes et des bacilles intestinaux non pathogènes (les colibacilles surtout).

Si l'on met en culture sans précautions ce mélange microbien, les bacilles non pathogènes se multiplient très rapidement, gênant la croissance du bacille typhique. Pour éviter cette difficulté à laquelle se sont heurtés les premiers chercheurs, on ajoute dans le milieu un produit chimique qui empêche la concurrence microbienne en inhibant le plus possible la pousse des germes autres que le bacille d'Eberth.

On réalise ainsi un milieu d'enrichissement sélectif.

De très nombreuses formules répondant à cette définition ont été proposées; elles se différencient par le ou les agents inhibiteurs choisis. Beaucoup ont été étudiées pour les besoins de la coproculture, car les selles contiennent aussi un mélange de bactéries pathogènes et non pathogènes qui doit être soumis à un enrichissement sélectif.

Nous examinerons dans cette étude, les milieux qui ont été spécialement créés pour la recherche du bacille

typhique dans l'eau, et ceux, utilisés par ailleurs en coproculture, qui ont été employés avec succès dans l'examen de l'eau.

Pour la recherche, on utilise ces milieux de trois façons.

a) On ensemence une petite quantité d'eau dans un volume suffisant de milieu;

b) On ensemence dans le milieu le mélange concentré de germes obtenus en filtrant l'eau ou en le précipitant par un hydroxyde métallique colloïdal;

c) On ajoute à la totalité de l'échantillon d'eau les produits nutritifs et les inhibiteurs nécessaires pour transformer cette eau en un milieu d'enrichissement sélectif.

Examinons ces trois groupes de techniques.

a) *Mise en culture d'une petite quantité d'eau.*

Dès 1878, avant même la découverte du bacille d'Eberth, PASTEUR et JOUBERT préconisent l'usage de milieux liquides pour l'examen bactériologique de l'eau.

Cette idée est reprise par MIQUEL (63), puis par CHANTEMESSE et WIDAL (1887), VINCENT (1890) et POUCHET (1891). Ces chercheurs utilisent un bouillon phéniqué à 0,20 à 0,25 %. 100 cc. de ce bouillon sont ensemencés avec des quantités d'eau variant de L à

C G. (VINCENT), à 100 cc. (POUCHET) et mis à l'étuve à 37° ou à 42° (VINCENT).

Mais l'expérience montre que l'acide phénique n'empêche pas la pousse du colibacille. Il est abandonné comme agent sélectif.

GAETHENS et ROTH (79) (1903) ajoutent à 200 cc. de bouillon nutritif contenant 0,5 % de caféine, 100 cc. d'eau à examiner.

HOFFMANN et FICKER (40) (1904) doublent la caféine, insuffisamment sélective, par du cristal violet.

DIENERT et GUILLERD (21 et 33) (1923) préconisent l'ensemencement de 50 cc. d'eau à examiner dans 50 cc. d'eau peptonée à 6 %. Ils ajoutent ensuite 4 % de bile et 2 cc. 5 d'une solution de vert malachite déjà préconisé par LŒFFLER. Remarquons l'utilisation de la bile, qui inhibe la pousse des bactéries gram + et favorise la pousse du bacille typhique. Son emploi est devenu classique en bactériologie.

SILBERSTEIN (90) (1935) ensemence 5 à 10 cc. d'eau dans 100 cc. de bouillon contenant 100 cc. d'une solution au millième de vert brillant (LEUCHS l'a substitué au vert malachite); le vert brillant est un des meilleurs colorants inhibiteurs du colibacille.

L'expérience a montré que ces divers procédés sont très peu efficaces pour la recherche du bacille typhique dans l'eau; nous avons vu que l'eau contient peu de bacille d'Eberth. et les quantités ensemencées sur ces

milieux sont trop faibles pour permettre sa mise en évidence.

Les procédés que nous avons cités ne sont pratiquement plus utilisés à l'heure actuelle.

b) *Culture après concentration.*

CHANTEMESSE (1891) et LOIR se sont précocement rendus compte de la nécessité de faire précéder l'enrichissement sur bouillon phéniqué d'une concentration groupant les germes de l'eau. (Filtration sur bougies pour ces auteurs).

Après eux, KACZYNSKY (47) (1913) immerge dans la bile pure le dépôt résultant de la filtration. Plus tard il utilise un mélange de bile, de caféine et de cristal violet.

SCHUSCHA (88) (1917) traite le produit résultant d'une précipitation par l'éther de pétrole, reprenant ainsi la technique préconisée par BIEDERAST.

D'autres bactériologistes adaptent des milieux déjà utilisés. Ainsi DIENERT et GUILLERD, après une précipitation par l'alumine, ensemencent le culot de centrifugation dans l'eau peptonée que nous avons mentionnée. Ils précisent avec une grande minutie, dont il faut s'inspirer pour mener à bien de telles recherches, le pourcentage de vert malachite à employer, qui varie selon les conditions de l'expérience.

Malgré ces soins, l'action sélective du vert malachite reste inférieure à celle d'autres produits que les bac-

tériologistes ont découvert depuis. L'usage de ces nouveaux inhibiteurs a permis l'élaboration de milieux qui ont donné des résultats expérimentaux très favorables et dont l'emploi s'est généralisé de nos jours.

MULLER (1923) met en évidence l'action inhibitrice du tétrathionate vis-à-vis du colibacille et des bactéries intestinales gram négatif autres que les Salmonella (65).

KAUFFMANN reprend ces expériences et, après de multiples modifications (1929 à 1935) établit la formule complexe d'un milieu d'enrichissement liquide connu sous le nom de bouillon au tétrathionate ou milieu de MULLER-KAUFFMANN (49).

WILSON et BLAIR utilisent les propriétés du sulfite de bismuth qu'ils ont déjà appliquées à un milieu d'isolement solide (gélose de WILSON et BLAIR) dans un bouillon d'enrichissement liquide. En plus du complexe de base, sulfite de soude, citrate de Bi., ce milieu comporte de la mannite et du vert brillant, de l'alcool absolu et du sublimé ($HgCl_2$), antiseptique fort, sélectif. La formule complète est donnée par LE MINOR (56).

Quelques auteurs anglo-saxons, (WILSON et BLAIR (110), HOUSTON (41), FERRAMOTA (26), enrichissent sur ce milieu le culot provenant d'une précipitation par par l'alumine. Bien que les résultats obtenus aient été assez intéressants, l'usage du milieu liquide de WILSON et BLAIR ne s'est pas généralisé.

Enfin LEIFSON (1936) met au point un milieu très simple, basé sur l'action sélective du sélénite de soude,

Il fait partie de récentes acquisitions américaines, en matière de technique bactériologique que nous avons la possibilité d'utiliser en France depuis trois ans.

c) *Transformation de l'eau en milieu de culture.*

Le principe de ce troisième mode d'utilisation des milieux sélectifs est déjà ancien.

En 1889, STRAUSS et DUBARRY conseillent, pour éviter toutes manipulations, de transformer l'échantillon d'eau à examiner en milieu de culture.

PERE, en 1890, met en pratique cette idée en utilisant l'acide phénique; il affirme en même temps la nécessité d'opérer sur une quantité assez importante d'eau.

FICKER et HOFFMANN (40) (1905) ajoutent à 900 cc. d'eau du nutrose, de la caféine et du cristal violet.

HODER (39) (1927) additionne 1.000 cc. d'eau de 1/10.000^{e} de vert malachite, puis de 100 cc. de bouillon bilié.

La sélectivité trop faible de ces formules amène PINTO (69) (1930) à proposer un milieu plus efficace. 800 cc. d'eau à examiner sont d'abord additionnés de 100 cc. d'eau peptonée à 10 %, de 50 cc. de bile, de 0,125 % de caféine et de 1/80.000^{e} de cristal violet, et mis vingt-quatre heures à l'étuve. Puis 5 cc. de la culture sont laissés six heures en contact avec 2 cc. d'éther de pétrole, puis repiqués.

Des recherches ont permis à PINTO d'isoler le bacille d'Eberth à condition que l'eau contienne au moins 19 bacilles par litre. Malgré ces résultats favorables, l'expérience a montré que l'action germicide de l'éther de pétrole s'étendait parfois au bacille typhique lui-même. En pratique, ce procédé a été abandonné.

SZPERS (94) (1935) reprend les constituants du milieu de MULLER-KAUFFMANN, les concentre et les ajoute à l'eau à examiner, la transformant ainsi tout entière en un bouillon au tétrathionate. Ce procédé a été repris et modifié par SUCKLING et ses collaborateurs (97) de 1939 à 1943.

On a préconisé enfin dans le même but une adaptation du milieu au sélénite de LEIFSON.

De ces énumérations ressortent deux milieux qui doivent retenir notre attention.

Ce sont le bouillon au tétrathionate de MULLER-KAUFFMANN et le milieu au sélénite de LEIFSON dans leurs deux utilisations.

a) Pour l'enrichissement du produit de germes concentrés résultant d'une filtration ou d'une précipitation;

b) Pour la transformation de l'échantillon d'eau en milieu de culture, selon les techniques de SZPERS et de SUCKLING.

Milieu de Kauffmann

C'est un bouillon de viande contenant du carbonate de calcium, de la bile, du vert brillant et surtout du tétrathionate de soude qui fait son originalité. Ce corps a été récemment l'objet d'un certain nombre d'études et, en particulier, des travaux minutieux de KNOX, GELL et POLLOCK (51).) Voici l'essentiel de leurs conclusions :

Le tétrathionate de soude est obtenu en faisant agir du thiosulfate de sodium (ou hyposulfite de soude) sur l'iode selon la réaction

$$2\ S_2O_3Na_2 + I_2 = 2\ NaI + S_4O_6Na_2$$

l'iode étant fourni par une solution iodo-iodurée. KNOX, GELL et POLLOCK ont étudié l'action sur les Salmonella de chacun des éléments de cette réaction.

Le tétrathionate, outre son action inhibitrice sur les autres bactéries gram néatif, et en particulier sur le colibacille, fournit au para B surtout, mais aussi au bacille d'Eberth, une source d'énergie supplémentaire, car il est réduit en thiosulfate sous leur influence.

L'iode en excès provoque l'inhibition totale des Salmonella et un excès de thiosulfate gêne la pousse du bacille typhique.

D'autre part, les composés polythioniques comme le tétrathionate de soude sont assez instables; ils peuvent se décomposer en produisant de l'acide sulfureux et du SO_2 comme terme final. Ces corps augmentent

encore l'acidité du milieu créé par la réduction du tétrathionate par certaines bactéries. Cette acidité gênant la pousse des Salmonella, il faut ajouter au milieu un système tampon. KAUFFMANN utilise à cet effet le carbonate de calcium. Mais ce sel de calcium favorise la pousse du Proteus déjà si fréquent dans l'eau.

Pour obtenir le meilleur équilibre des constituants, on a intérêt à préparer le tétrathionate en respectant le plus possible les quantités indiquées par la réaction chimique, avec pourtant un léger excès d'hyposulfite.

Cette étude nous montre la nécessité d'une préparation très soigneuse du milieu de KAUFFMANN sous peine de déboires certains. Elle confirme d'autre part certains inconvénients du bouillon au tétrathionate, dont la sélectivité n'est pas absolue. Le Proteus y pousse bien, ainsi que certains bacilles gram négatif du groupe coliformes comme l'aérobacter aérogenès (WYNNE et WILLIAMS (112).

Malgré ces critiques, le bouillon au tétrathionate reste un des meilleurs milieux d'enrichissement que nous possédions. C'est l'opinion exprimée par de nombreux bactériologistes qui l'ont utilisé avec succès dans leurs recherches. Nous avons, à ce sujet, consulté avec profit les publications françaises de BUTTIAUX, BRISOU, LE MINOR, JUDE et SOHIER, GRÉGOIRE, ROLIN et BETHOUX (11, 9, 56, 46, 91).

Bien que la formule du milieu soit nettement établie, il existe de petites divergences quant aux quantités de

produits à employer et à l'ordre d'introduction des constituants. Voici une des méthodes de préparation les plus commodes et les plus efficaces.

On dispose de deux solutions fraîches.

Solution A.

Hyposulfite de soude, 5 OH_2	50 grs.
Eau distillée q; s. p.....	100 cc.

(Stériliser).

Solution B.

Iode	20 grs.
Iodure de potassium.....	25 grs.
Eau distillée q; s. p.....	100 cc.

(Solution faite à froid et non stérilisée).

Au moment de l'emploi :

Bouillon de viande stérile	90 cc.
Carbonate de calcium stérile	5 grs.

Préparer rapidement un mélange de 2 cc. de solution B. et de 10 cc. de solution A et le verser aussitôt dans le bouillon (ceci pour éviter les précipitations). Bien mélanger.

Ajouter enfin :

Solution aqueuse au 1/1.000^{e} de vert brillant	1 cc.
Bile stérile	5 cc.

Agiter soigneusement et répartir en tubes stériles à raison d'environ 10 cc. par tube. Ainsi préparé, ce

milieu est de bonne conservation. Il se forme normalement au fond du tube un dépôt blanc de carbonate de calcium.

A côté de cette formule classique, signalons qu'aux U. S. A. on trouve dans le commerce un milieu déshydraté appelé chez DIFCO (23) « tétrathionate broth base ». Il suffit de dissoudre une quantité donnée (4 grs. 6) de poudre dans 100 cc. d'eau, de stériliser rapidement et d'ajouter après refroidissement 2 cc. de la solution que nous avons désignée sous le nom de solution B iodo-iodurée.

Pour rechercher le bacille typhique dans l'eau, on utilise le milieu de KAUFFMANN de deux façons.

a) Après concentration du mélange microbien par un procédé physique, on ajoute la quantité appropriée du milieu de KAUFFMANN dans le récipient qui contient le dépôt résultant par exemple d'une filtration (WEINBERG). Ou bien, on ensemence les culots de centrifugation obtenus après traitement à l'alumine dans des tubes de bouillon au tétra-thionate. Pour enrichir le dépôt ou les culots résultants du traitement d'un litre d'eau, il faut prévoir de 150 cc. à 200 cc. de milieu de KAUFFMANN.

b) Pour transformer l'eau en milieu de culture. C'est la technique que nous avons vu préconisée par SZPER. Après de nombreuses expériences sur de l'eau artificiellement souillée par des bacilles d'Eberth en quantité connue, et sur de l'eau naturelle, SZPERS utilise une

formule qui reproduit à peu près exactement les proportions du milieu de KAUFFMANN courant.

Extrait de viande concentré ..... 100 cc.
(1 kgr. de viande pour 400 cc. d'eau).
Chlorure de sodium ..... 2 grs.
Peptone ..... 5 grs.
Bile concentrée 3 fois par évaporation .... 8 cc.
Carbonate de calcium stérile ..... 22 gr. 5

Stériliser 40 minutes en vapeur fluante puis ajouter :
Solution stérile à 50 % de thiosulfate Na . 40 cc.
Solution iodo iodurée (voir solution B) .... 8 cc.
Solution aqueuse au 1/1000° de vert brillant 4 cc.
Agiter.

Ainsi préparé, le milieu doit être utilisé dans les trois jours. Pour l'examen, on ajoute 1.000 cc. d'eau à examiner à 200 cc. du milieu.

SUCKLING et ses collaborateurs ont refait ces expériences, confirmé l'efficacité de la méthode, mais ils proposent une préparation un peu différente, permettant une plus grande richesse du milieu. Pour éviter l'inconvénient des milieux de SZPERS (très courte conservation) ils préparent un certain nombre de solutions qui sont assez stables et sont au moment de l'emploi ajoutées en quantités définies à l'eau.

Solution A

Bouillon de viande 5 fois concentré .. 300 cc.
Carbonate de calcium ..... 75 grs.
Stériliser

Solution B

Hyposulfite de soude, 5 OH_2 ..... 75 grs.
Eau distillée q. s. p. ..... 125 cc.
Stériliser dans une fiole de 200 cc.

Solution C

Dissoudre 7,5 gr. d'IK dans une petite quantité d'eau distillée, ajouter 6 gr. d'iode et compléter à 30 cc.
Ne pas stériliser

Solution D

Solution aqueuse à 15 % de bile de bœuf desséchée ..... 50 cc.
(poudre bacto-oxgall de Difco)
(peut être remplacée par 70 cc. de bile stérile).

Solution E

Solution aqueuse de vert brillant au 1/1000° 15 cc.

Pour examiner un litre d'eau verser l'eau suspecte dans le bouillon A et y ajouter rapidement le mélange obtenu en transvasant la solution C dans la solution B. Tout ce temps doit être exécuté très vite pour éviter les précipités. On agite, puis en mélangeant à chaque addition, on ajoute la solution D, puis la solution E.

Rappelons enfin que quelque soit la méthode suivie, il convient de repiquer le milieu de KAUFFMANN à la 20e heure et à la 40e heure. Certains auteurs préconisent suivant les indications mêmes de KAUFFMANN un repiquage précoce entre la 5e et la 8e heure, il peut parfois donner de bons résultats.

Milieu au sélénite

C'est un milieu plus simple que celui de KAUFFMANN. Il y a quelques différences entre le milieu au sélénite de LEIFSON, celui connu sous le nom de sélénite F, et la poudre préparée par les Etablissements Difco ou par le Baltimore Biological Laboratory. En pratique, on utilise les milieux déshydratés stables et pratiques à préparer, mais il est possible de le fabriquer au laboratoire, à condition de pouvoir se procurer le sélénite acide de soude, assez rare dans le commerce.

Pour 1000 cc. d'eau, on pèsera :

Sélénite acide de soude	4 grs
Peptone	5 »
Phosphate de soude anhydre	10 »
Lactose	4 »

Ces divers constituants sont dissous à l'ébullition douce. Répartir ensuite selon besoins et stériliser 30' au plus en vapeur fluante. Conserver dans la glacière.

Précisons qu'on aura intérêt à constituer les 10 grs de phosphate par un mélange tampon de phosphate disodique et de phosphate monosodique, dont on déterminera expérimentalement les proportions de façon à obtenir un pH final de 7, la stabilité de ce pH étant importante.

Nous utiliserons ce milieu exactement comme nous avons employé le bouillon au tétrathionate, pour l'enrichissement secondaire du dépôt de filtration ou du culot de centrifugation après précipitation.

D'autre part, la simplicité du milieu nous permet d'envisager une technique d'enrichissement direct de l'échantillon d'eau à examiner, utilisé comme base liquide. Ce procédé a été également préconisé pour l'urine.

Faire dissoudre les différents constituants dans une petite quantité (100 à 200 cc.) d'eau distillée chaude et stériliser. Laisser refroidir. Ajouter ce milieu concentré à 1000 cc. d'eau à examiner contenue dans un grand ballon stérile. Mettre à l'étuve.

L'étude expérimentale du milieu au sélénite a montré que l'instant optimum de repiquage se situe entre la dixième heure et la vingtième heure. En effet, à ce moment, les bacilles typhiques et paratyphiques ont bien poussé ainsi que le Proteus et le bacille pyocyanique. Le colibacille et l'entérocoque sont très retardés, les bacilles dyssentériques et le faecalis alcaligénès ont pratiquement disparu.

Le milieu de KAUFFMANN et le bouillon au sélénite restent les deux formules les plus efficaces que nous pouvons utiliser. Il est assez difficile de trancher entre eux deux, car ils ont à peu près la même sélectivité et les mêmes inconvénients. Aucun des deux en effet n'élimine le Proteus et même certains bacilles Lactose négatif saprophytes.

Nous ne possédons pas la formule idéale qui ne laisserait pousser que les bacilles typhiques et paratyphiques. Mais les deux milieux liquides que nous avons envisagé nous permettent quand même d'obtenir de

bons résultats. Le milieu au sélénite présente cependant un avantage marqué sur celui de KAUFFMANN. Ce sont sa simplicité et sa facilité de préparation qui en font en fin de compte la meilleure formule que nous possédions. Quant aux inconvénients que nous avons signalé, un isolement soigné et une minutieuse identification nous permettront de les surmonter.

B) TECHNIQUES D'ISOLEMENT

Les méthodes d'enrichissement permettent d'obtenir une culture particulièrement abondante de bactéries pathogènes.

Le but de l'isolement est d'arriver à des colonies séparées les plus pures possibles, susceptibles d'être identifiées. Pour cela, on repique le milieu liquide d'enrichissement sur un milieu solide nutritif. Mais on n'est pas certain que la culture utilisée soit pure ; l'expérience montre au contraire la persistance de bactéries saprophytes à côté des bacilles pathogènes recherchés. Le milieu solide d'isolement devra donc permettre de différencier les colonies obtenues, et avoir d'autre part un pouvoir sélectif marqué.

Cette technique, à la différence de celles que nous avons envisagées jusqu'à maintenant, n'est pas spéciale à la recherche du bacille typhique dans l'eau. Toute recherche du bacille d'Eberth dans un produit pathologique ou souillé (lait, viande, coquillages, selles et urine) utilise à un moment quelconque, des milieux d'isolement sélectifs.

La coproculture très fréquemment pratiquée au laboratoire, a obligé de nombreux chercheurs à mettre au point de tels milieux. Les bactériologistes qui recherchent le bacille d'Eberth dans l'eau les ont utilisé, le plus souvent sans les modifier.

Ces milieux peuvent se classer en trois groupes :

1° Les milieux qui ont été proposés de 1900 à 1930 et dont certains sont restés classiques jusqu'à ces dernières années.

2° Des milieux qui correspondent à des bouillons d'enrichissement déterminés.

3° Les milieux américains récents introduits en France depuis 1944.

1. Milieux classiques

Dans ce groupe, nous ne citerons que les formules qui ont, en leur temps, apporté des éléments nouveaux plus efficaces. Deux tendances ont marqué leur évolution.

a) Certains bactériologistes ont préconisé l'usage d'une gélose additionnée d'un antiseptique inhibiteur du coli et donnant une couleur spéciale aux colonies de Salmonella. Ces inhibiteurs sont : pour PULCHER : la caféine et le wasserblaü, pour RÉMY (72) l'asparagine et un complexe de trois acides, pour LŒFFLER : le vert malachite, pour LEUCHS : le vert brillant et pour CONRADI : un mélange de vert brillant et d'acide picrique.

b) D'autres utilisent le Lactose dont la fermentation est le test de différenciation essentielle des bactéries intestinales gram. négatif. Leurs milieux comprennent donc du Lactose, un indicateur d'acidité, et en général un inhibiteur du colibacille. Tous sont donc des géloses lactosées auxquelles on ajoute du tournesol (CHANTEMESSE), du rouge congo (SCHMITZ et CHANDELIER), du tournesol et du cristal violet (DRIGALSKI-CONRADI), du tournesol et des sels biliaires (DUNSCHMANN) ou de la fuschine basique et du sulfite de soude (gélose d'Endo dont il existe une modification par addition de sels de lithium).

L'efficacité de tous ces milieux, y compris la gélose d'Endo qui a rendu de si précieux services, est inférieure à celle des milieux que nous allons étudier. Les résultats expérimentaux obtenus par COPE et KASPER (19), HYNES (42), MAYFIELD et GOBER (60), NETTER et CLARK (67) et VOLLENWEIDER (105) qui les ont comparés, le prouvent.

2. Milieux spéciaux

DIENERT et GUILLERD, KAUFFMANN et WILSON et BLAIR ont utilisé des milieux d'isolement correspondant aux bouillons enrichissants qu'ils ont préconisés.

a) Pour le repiquage de leur bouillon au vert malachite, DIENERT et GUILLERD (21-33) préconisent une gélose au sous acétate de plomb, dans laquelle les colonies suspectes franchement noires ou brunes seront prélevées après 24 heures d'étude pour être identifiées.

Les auteurs recommandent de déterminer empiriquement la quantité d'acétate de plomb à ajouter au milieu, quantité sur laquelle repose toute la valeur de la méthode. Malgré les bons résultats qui ont été obtenus, il faut rappeler que les germes (coli et para-coli, Proteus et Salmonella autres que les bacilles typhiques et paratyphiques B) produisent des colonies noires ; ceci oblige à de nombreuses identifications inutiles.

b) KAUFFMANN a modifié pour le repiquage du bouillon au tétrathionate la gélose de KRISTENSEN, LESTER et JURGENS. Ce milieu assez peu utilisé en France, nous a été récemment proposé par LE MINOR, BRISOU, BUTTIAUX et JUDE. (56-9-11-46).

A 100 cc. de gélose nutritive à 2,5 % contenant 1,5 % de lactose, ramenée à pH 7 à 7,2, et fondue au moment de l'emploi, ajouter :
4 cc. d'une solution de rouge de phénol, ainsi composée:

Rouge de phénol	1 gr.
Soude N/10	40 cc.
Eau distillée q. s. p.	500 cc.

et 0,15 à 0,20 cc. d'une solution aqueuse à 0,5 % de vert brillant (selon détermination expérimentale à refaire quand on change de marque ou de qualité de vert brillant).

Le milieu ainsi obtenu, de teinte brun verdâtre, se conserve quinze jours à la glacière. Après 24 heures d'étuve, les Salmonella et les Schigella y donnent des colonies rouges, les coli sont en partie inhibés ou don-

nent des colonies vertes, le Proteus donne théoriquement des colonies jaunâtres, mais en pratique, elles sont souvent à peu près analogues à celles des pathogènes. C'est là le plus gros inconvénient.

Signalons aussi que KAUFFMANN a modifié dans le même but le milieu de DRIGALSKI. Il préconise une gélose nutritive lactosée à 15 %, avec du tournesol comme indicateur, du cristal violet et de l'hyposulfite à 0,1 % de la masse. Ce milieu donne des indications moins précises que la gélose au vert brillant que nous venons de voir, mais son avantage (LE MINOR) est de laisser intactes les propriétés d'agglutination du bacille d'Eberth. Ceci peut être intéressant pour le chercheur qui pratique l'identification par la Sérologie.

c) Au bouillon d'enrichissement de WILSON et BLAIR correspond pour l'isolement la gélose sélective au sulfite de bismuth de WILSON et BLAIR.

Dès 1922, WILSON (108) précise les propriétés du sulfite de bismuth. A partir de 1927, le milieu de WILSON et BLAIR est utilisé par de nombreux bactériologistes, en particulier dans les pays anglo-saxons. Pour la recherche du bacille typhique dans l'eau, il a donné de très bons résultats à WILSON et BLAIR (110). HOUSTON (41) et au London Metropolitan Water Board Laboratory (61), GRAY (32) et SUCKLING (97) en Grande-Bretagne, STEWART et GHOSAL (93) aux Indes, CERNOZUBOW (14), RUYS et VAN LONGHEM (83) et (101) aux Pays-Bas. Introduit assez tard en France (CARRIEU et LISBONNE (12) (1940) dans la pratique

courante, il a été récemment employé par BRISOU, BUTTIAUX, JUDE, LE MINOR et SALINIER (9-11-46-56-85).

Plusieurs bactériologistes veulent comparer l'efficacité de la gélose au sulfite de bismuth avec celle du bouillon au tétra-thionate. Il semble qu'il y ait là une confusion, car, au moins dans l'examen de l'eau, on n'aura pas à utiliser simultanément ces deux milieux qui prennent place dans deux points bien différents de la technique. Le bouillon au tétra-thionate est un milieu d'enrichissement, la gélose au sulfite de bismuth est un milieu sélectif d'isolement.

L'efficacité du milieu de WILSON et BLAIR est due :

a) au sulfite de bismuth qui en présence de glucose est réduite en sulfate par certaines Salmonella (différenciation des colonies).

b) à l'action inhibitrice pour la croissance du coli et des coliformes du vert brillant et du sulfite de bismuth en présence d'un excès de sulfite de soude.

Depuis la première formule de WILSON, de nombreuses modifications ont été apportées à la préparation du milieu par WILSON et BLAIR à plusieurs reprises, par TABET (95) et plus récemment par TYAGARAJA (99). Malgré ces améliorations, le milieu reste difficile à préparer.

Le citrate de bismuth ammoniacal se trouve peu aisément dans le commerce. Au besoin, on peut le préparer au laboratoire (LE MINOR).

La solution de sulfate ferreux doit être exempte de sulfate ferrique ; on l'additionne de quelques gouttes d'acide sulfurique $\frac{N}{2}$ — pour en assurer la limpidité et éviter la formation d'oxyde. Le sulfate ferreux, peu stable, est difficile à conserver, peut être remplacé par du citrate de fer ammoniacal et du sulfate de soude.

A la place du phosphate de soude pur anhydre de la formule originale, on emploie pratiquement du phosphate de soude cristallisé avec 12 molécules d'eau.

Pour éviter au maximum les précipitations du sel de bismuth, on a intérêt à avoir des solutions prêtes à l'avance que l'on ajoute à l'emploi dans un ordre déterminé.

Quoique la formule du milieu de WILSON et BLAIR soit bien connue, nous jugeons cependant utile de signaler une méthode qui a l'avantage d'en faciliter beaucoup la préparation (BUTTIAUX).

On prépare deux solutions :

Solution A

Faire dissoudre : d'une part, 3 gr. de citrate de bismuth ammoniacal dans 25 cc. d'eau distillée bouillante;

d'autre part, 10 gr. de sulfite de soude pur anhydre dans 50 cc. d'eau distillée bouillante.

Mélanger rapidement et ajouter à chaud : 10 gr. de phosphate disodique, 12 OH_2.

Laisser refroidir, et quand le mélange est froid, ajou-

ter : 5 gr. de glucose dissous dans 25 cc. d'eau distillée bouillante.

Agiter doucement pour mélanger.

Solution B

Mélanger :

Citrate de fer ammoniacal à 1 % dans l'eau 200 cc.
Vert brillant à 1 % dans l'eau ..... 25 cc.

Ces deux solutions se conservent plusieurs mois si on les laisse en flacons stériles, bouchés au caoutchouc.

A l'emploi :

Préparer 50 cc. de gélose nutritive à 3 % de gélose, la faire fondre et ramener à 70°. Ajouter alors :

10 cc. de solution A.
2,25 cc. de solution B.

Agiter doucement et couler en boîtes de Pétri.

La modification recommandée par TABET (moins de sulfite et plus de phosphate) n'est intéressante que pour le para B, celle de TYAGARAJA rend la fabrication du milieu plus difficile et change totalement l'aspect des colonies. Elle est intéressante en pays chaud.

J. A. de LOUREIRO (57) propose une méthode de préparation assez semblable à celle que nous avons indiquée ; il utilise trois solutions :

A - (citrate de bismuth ammoniacal).

B - (sulfite et phosphate).

C - (glucose et fer),

qui se conservent plusieurs mois (7 à 8 mois). Cette technique a permis l'obtention d'excellents résultats.

Il existe un milieu déshydraté préparé par la firme Difco, sous le nom de B.B.S.A. (bacto bismuth-sulfit-agar) contenant les proportions classiques des différents produits. Il est d'une préparation extrêmement aisée et d'une fixité de formule qui rend le résultat indépendant des erreurs possibles de manipulation.

Sur tous les milieux que nous avons indiqué, sauf sur celui de TYAGARAJA, les colonies ont le même aspect.

Le bacille typhique donne des colonies noires typiques, entourées d'une auréole foncée à reflets métalliques.

Le para B donne les mêmes colonies, mais plus lentement, parfois en 48 heures.

Les colibacilles sont partiellement inhibés et donnent des colonies verdâtres.

On a adressé de nombreuses critiques à la gélose au sulfite de bismuth. Voici les principales.

1° Difficultés de préparation du milieu ; ceci est en partie éliminé par l'usage des milieux déshydratés.

2° Certains bacilles (B aérogénés et B effluviei) peuvent donner des colonies noires avec parfois même une amorce de halo.

3° Certains Flexner et Sonne poussent comme des Salmonella.

4° Pour que les colonies de bacilles typhiques aient le reflet métallique, il faut qu'elles soient nettement séparées et non confluentes. Bien plus, dans les meilleures circonstances, ces bactéries pathogènes peuvent ne donner que des colonies vertes. Ceci est rare, il est vrai.

5° Le Proteus pousse très bien en donnant des colonies noires semblables à celles des Salmonella. Mais le germe perd son caractère envahissant, ce qui est un avantage certain.

Il est possible de parer en partie à ces inconvénients en observant un certain nombre de précautions.

a) Respecter scrupuleusement les conditions de fabrication du milieu, si l'on n'utilise pas un produit déshydraté. Vérifier avec des souches connues les caractères typiques des colonies.

b) Faire un ensemencement en séparation sur plusieurs boîtes avec le même produit pour obtenir des colonies bien isolées.

c) Prélever aux fins d'identification non seulement les colonies typiques, mais aussi les colonies brunes suspectes.

d) Si l'isolement semble mauvais, ne pas repiquer l'amas de colonies suspectes sur une autre boîte de WILSON et BLAIR, mais utiliser une gélose lactosée plus simple, par exemple le milieu de MAC CONKEY solide, différent du bouillon bilié lactosé au bromo-crésol pour le diagnostic différentiel du bacille d'Eberth et du colibacille.

C'est une gélose lactosée à 1 %, biliée à 0,5 %, avec du rouge neutre comme indicateur (0,03 %) et du cristal violet (0,01 %). Elle existe sous forme déshydratée (Difco). Le milieu doit être bien sec et assez épais. Le colibacille donne des colonies rouges, les Salmonella des colonies incolores, celle du bacille d'Eberth sont de plus assez transparentes. Ce milieu n'étant que très légèrement sélectif ne peut convenir pour un isolement direct.

e) Enfin, on a intérêt à repiquer le bouillon d'enrichissement simultanément sur gélose au sulfite de bismuth et sur un des milieux solides d'origine américaine. On obtient ainsi de bien meilleurs résultats.

3. Milieux américains

Pour la recherche du bacille typhique dans l'eau, on utilise surtout 3 milieux désignés couramment par les initiales : S. S., D.O.C. et E.M.B.

a) *Gélose S. S.*

C'est un des milieux les mieux connus. Elle est présentée sous forme déshydratée (Difco). (23)

Nous connaissons plusieurs formules possibles. Voici la plus classique :

Extrait de viande	5 grs
Protéose-peptone N° 3	5 grs
Lactose	10 grs

Sels biliaires	8,5 grs
(ou bile de bœuf : 100 cc.)	
Citrate de soude	8,5 grs
Hyposulfite de soude	8,5 grs
Citrate de fer ammoniacal	1 grs
Gélose en poudre	13,5 grs
(ou gélose ordinaire : 17 grs)	
Vert brillant	0,0033 grs
Rouge neutre	0,025 grs

pH final : 7

Ces quantités valent pour 1000 cc. d'eau distillée. Si on utilise le milieu déshydraté : Faire dissoudre 6 grs de poudre dans 100 cc. d'eau distillée stérile en portant rapidement à l'ébullition 2 à 3 minutes, pas plus. Couler en boîtes de Pétri. Ce milieu se conserve 8 à 10 jours à la glacière, mais on a intérêt à le préparer extemporanément.

Il est plus simple et plus sûr d'utiliser des milieux déshydratés : car certains constituants : (sels biliaires, complexes de citrates) sont assez difficiles à obtenir pour un laboratoire de recherches pratiques.

Aspect des colonies : Après 24 heures à 37°.

Salmonella : Colonies incolores, avec pour celles produisant SH_2 un petit point marron central apparaissant en 24 à 48 heures.

Schigella : Colonies incolores ou faiblement rosées (Sonne).

Protéus : Colonies foncées, à auréole blanchâtre, non envahissantes.

Colibacille : Très inhibé, colonies rouge framboise.

Ce milieu bien qu'excellent n'élimine ni le Proteus, ni certains lactoses négatifs comme le bacille de Morgan, et l'on peut avoir plusieurs colonies suspectes à repiquer. Mais il est suffisamment sélectif, très simple à préparer et très facile à lire, tous avantages évidemment fort appréciables. (BRISOU 9, BUTTIAUX 11, JUDE 46, VOLLENWEIDER 105, DESBORDES, 20).

b) *Milieu D. O. C.*

Il est plus connu sous le nom de Gélose au désoxycholate citrate.

LEIFSON a mis en évidence les propriétés du désoxycholate de soude à un pH compris entre 6, 8 et 7,2 ; propriétés analogues à celles de la bile, mais plus accentuées : c'est-à-dire inhibition des germes gram. positif et pousse accélérée des germes intestinaux pathogènes gram. négatif. La formule actuelle du milieu D.O.C. comporte, outre de désoxycholate de soude, du citrate de soude, du citrate de fer, du lactose et du rouge neutre indicateur.

Ainsi préparé, le milieu D.O.C. est superposable à la gélose S.S. et d'ailleurs historiquement, le milieu S.S. dérive du milieu D.O.C. par addition de vert brillant, inhibiteur supplémentaire, et substitution au désoxycholate de soude pur d'un complexe de sels biliaires

(appelés chez Difco : bactobilsalts N° 3) contenant une forte proportion de désoxycholate.

Nous n'insisterons pas sur le milieu D.O.C. malgré son efficacité, car, en pratique, il est plus favorable à la pousse des bacilles dyssentériques qu'à celle des Salmonella. Il vaut mieux nous en tenir à la gélose S.S. qui nous donnera des colonies plus nettes et plus lisibles de bacilles typhiques et paratyphiques.

c) *Milieu E. M. B.*

Modification du milieu de LEVINE (9) et aussi de celui de SALLES (1927) et du milieu de TEAGUE c'est une gélose nutritive à 5 p. 1.000 de lactose et de saccharose, avec 0,2 % de phosphate dipotassique, 0,4 p. 1.000 d'éosine et 0,065 % de bleu de méthylène.

Orange après la stérilisation, le milieu reprend sa teinte normale quand on l'agite.

Le colibacille, dont la pousse n'est gênée par aucun inhibiteur, donne, sur le fond rose du milieu, des colonies plus rouges avec un centre sombre qui a parfois des reflets verdâtres.

Les bactéries pathogènes donnent des colonies incolores facilement reconnaissables.

Les avantages du milieu sont la netteté de la lecture, à condition que les colonies soient bien isolées et l'élimination de certains germes du groupe coli ou paracoli qui fermentent le saccharose mais pas le lactose.

Les inconvénients en sont l'absence totale de sélecti-

vité et en particulier la pousse facile de l'entérocoque qui donne des colonies absolument semblables à celles des Salmonella.

Nous utiliserons ce milieu pour parfaire un isolement douteux sur gélose de WILSON et BLAIR ou sur gélose S.S. et nous retiendrons l'idée de l'utilisation du double sucre qui peut être appliquée avec profit à la fabrication de la gélose S.S. On ajoutera en même temps que les 10 grs de lactose, 10 grs de saccharose qui donnera aux colonies des germes qui le fermentent une teinte rouge les distinguant des colonies des germes pathogènes.

Parmi tous ces milieux d'isolement, nous avons vu qu'il faut retenir : le milieu de WILSON et BLAIR, la gélose S.S., la gélose au vert brillant modifiée par KAUFFMANN, qui sont hautement sélectifs, et dans un but un peu différent, le milieu E.M.B. et le milieu de MAC CONKEY modifié, qui le sont beaucoup moins.

C) TECHNIQUES D'IDENTIFICATION

L'identification d'une Salmonella en général est spécialement d'un bacille typhique ou paratyphique est dans l'état actuel de la technique une opération bien connue.

Nous nous bornerons à indiquer ici les procédés récents qui nous permettront de reconnaître le bacille typhique que nous aurons isolé de l'eau.

Une identification complète comprend :

a) Etude morphologique.
b) Etude biochimique.
c) Etude sérologique et étude antigènique.
d) Classification par le bactériophage.

En dehors des références originales, nous avons consulté avec profit certaines publications récentes (BRISOU 9, BUTTIAUX 11, CIAUDO 17, JUDE 46, ROLAND 76, VOLLENWEIDER 106).

1. Etude morphologique

Elle comprend deux points essentiels : examen après coloration et étude de la mobilité.

Si le classique examen microscopique après coloration de gram, est toujours employé, l'étude de la mobilité entre lame et lamelle a fait place à une technique utilisant une gélose semi-liquide connue sous le nom de milieu de TITTSLER et SANDHOLZER, modifié par DARLY. Il sera ainsi préparé :

Peptone	20 grs
Chlorure de sodium	5 grs
Gélose	5 grs
Eau distillée	1000 cc.

Le pH doit être compris entre : 6,8 et 7,2

On répartit en tubes, à raison de 8 cc. par tube, et on stérilise 20' à 121°.

Refroidir en maintenant le tube vertical.

On ensemence par piqure centrale et on met à l'étuve à 37°. La lecture se fait après 8 heures, 24 heures

et 48 heures (Contrôle). Les bacilles mobiles cultivent rapidement en diffusant et en troublant le milieu. Les bacilles immobiles poussent le long de la ligne d'ensemencement. Les expériences ont montré que les résultats lus après 24 et 48 heures sont supérieurs en précision à ceux du microscope.

2. Etude biochimique

L'introduction des milieux américains à deux sucres et indicateurs de SH_2, dont le culot est assez haut pour permettre une culture en aérobiose et anaérobiose, a complètement transformé les galeries classiques d'identification biochimique.

Rappelons le comportement du bacille typhique sur un tel milieu.

Le bacille d'Eberth attaque le glucose et produit une acidification totale du milieu : l'indicateur d'acidité (rouge de phénol) vire au jaune. Puis le glucose étant épuisé, le bacille a recours, mais en aérobiose seulement, c'est-à-dire sur la surface inclinée, à l'aliment peptoné qu'il attaque en produisant de l'ammoniaque qui fait virer l'indicateur au rouge.

De plus, le dégagement de SH_2 fait noircir le sel de plomb ou de fer contenu dans le milieu, avec un maximum à la limite de la pente et du culot.

Pour d'autres bacilles, la dislocation du culot indiquera la production de gaz par fermentation des sucres.

Pour parvenir à un milieu aussi complexe, une assez longue évolution a été nécessaire.

RUSSEL, le premier, applique à un milieu le principe de deux sucres. Il utilise une gélose lactosée à 10 p. 1.000, glucosée à un p. 1.000, avec l'indicateur d'Andrade.

NICHOLS et WOODS, après lui, remplacent l'indicateur d'Andrade par du rouge de phénol et signalent qu'il ne faut pas boucher ce tube au caoutchouc sous peine de créer une anaérobiose légère dans tout le tube. A ce moment, l'Eberth n'attaque que le glucose et donne un tube entièrement jaune comme le colibacille.

KRUMWIEDE et KOHN ajoutent un troisième sucre : le saccharose. On peut ainsi plus facilement éliminer certains para-colibacilles fermentant peu le lactose, et certains Proteus. Mais cette certitude n'est pas absolue et l'on peut voir de fausses réactions car certaines Salmonella et Schigella donnent des aspects semblables à celui de l'Eberth.

KLIGER, dans le même temps, préconise une gélose semi-solide au glucose et à l'acétate de plomb permettant l'étude de la mobilité, de la fermentation du glucose te de la production de SH_2. Ultérieurement l'acétate de plomb a été remplacé par du citrate de fer ammoniacal et par un mélange de sulfate ferreux et de sulfate de soude.

Les combinaisons de ces formules ont donné naissance à deux milieux que nous utilisons à l'heure actuelle.

Kliger, Iron, Agar.

C'est un milieu combinant le principe du milieu de RUSSEL modifié par NICHOLS et WOODS et celui du milieu de KLIGER.

C'est une gélose nutritive lactosée à 2 %, glucosée à 1 % et contenant 0,2 p. 1000 de sulfate de fer, 0,4 p. 1000 de sulfite de soude et 0,08 p. 1000 d'hyposulfite de soude. L'indicateur est le rouge de phénol à 0,025 p. 1000.

Milieu de Hajna.

Il combine la formule de KRUMWIEDE et KOHN et celle de KLIGER modifiée. C'est une gélose à trois sucres et à indicateur de SH_2. (34)

Pratiquement, si l'on peut se procurer le Kliger, Iron, Agar sous forme déshydratée, sa fabrication en est très simple. Sinon le milieu de HAJNA est aisé à préparer avec les produits courants au laboratoire.

ROLAND a modifié sa formule en supprimant simplement le saccharose puisque les avantages de l'addition de ce troisième sucre sont, en réalité, minimes.

Au laboratoire, on le prépare ainsi :

Pour 1000 cc de H_2O :

Gélose en poudre	13 grs
(ou gélose ordinaire 20 grs)	
Peptone nutritive	20 grs
Chlorure de sodium	5 grs

Dissoudre dans l'autoclave ouvert et ajuster à pH : 7,5

Ajouter :

Lactose	10 grs
Glucose	1 grs
Hyposulfite de soude	0,2 grs
Sulfate ferreux ammoniacal	0,2 grs

A ce moment le pH doit être de 7,4

Ajouter pour finir :
Solution aqueuse à 1 % de rouge de phénol 2,5 cc.

Répartir à raison de 10 cc. par tube. Stériliser 15' à 110°, laisser refroidir en position verticale, le milieu devient rouge cerise.

On a intérêt à utiliser un milieu fraîchement préparé comme en général d'ailleurs pour tous les milieux américains.

Au moment de l'emploi seulement, faire fondre la gélose et incliner le tube de façon à avoir un bon culot de 3 cm. au moins. Solidifier rapidement et ensemencer par un piqure profonde dans le culot et un ensemencement large sur la pente. Ne pas boucher au caoutchouc.

Après 24 heures d'étuve, on peut lire les indications suivantes :

La fermentation du glucose se traduit par un culot jaune, disloqué ou non par les gaz.

La fermentation du lactose se traduit par une pente jaune.

La production de SH_2 se traduit par un noircissement du milieu à la limite de la pente du culot. Ce phénomène n'est parfois net qu'après 48 heures pour le bacille typhique ; il s'étend au culot pour le para B.

En tenant compte de ces indications de base, les différents aspects du milieu s'interpréteront ainsi.

Culot jaune. Pente rouge. $SH_2 +$ (48 heures parfois)
Salmonella typhi

Culot jaune avec gaz. Pente rouge $SH_2 +$.
Salmonella paratyphi B et son groupe.
Proteus.
Bacille de Morgan.

Culot jaune avec gaz. Pente rouge. $SH_2 = O$
Salmonella paratyphi A.

Culot jaune. Pente rouge. $SH_2 = O$.
Schigella.

Culot jaune avec gaz. Pente jaune. $SH_2 \pm$
Colibacille et paracoli.

Le bacille d'Eberth présente, on le voit, un aspect assez spécial qui oriente rapidement la recherche.

De faux aspects peuvent cependant être donnés par certains Proteus qui produisent très peu de gaz. Pour différencier le Proteus que les milieux d'enrichissement ou d'isolement sélectifs n'ont pas toujours éliminés, on peut employer le test d'Anderson (2).

Il est basé sur un travail de RUSTIGIAN et STUART (9). Ces auteurs constatent que le Proteus en milieu tamponné, attaque constamment l'urée sous l'action d'une uréase spécifique.

L'exécution du test s'effectue sur milieu de FERGUSSON et HOOK (28) ainsi préparé :

Eau distillée	100 cc.
Urée	2 grs
Phosphate monopotassique	0,1 grs
Phosphate dipotassique	0,1 grs
Chlorure de sodium	0,5 grs
Alcool absolu	1 cc.

Ajouter une solution de rouge de phénol à 0,2 % en quantité suffisante pour obtenir une coloration jaune nette. (On peut utiliser aussi le bleu de bromothymol).

On stérilise le milieu par filtration sur bougie L3, ou on le conserve à la glacière, au choix.

Le test lui-même se réalise ainsi :

Mettre 0,1 cc. de milieu dans un tube à hémolyse et ensemencer largement. A l'étuve à 37°, examiner de 5' en 5' pendant une demi-heure à trois quarts d'heure. Le Proteus en poussant forme du carbonate d'ammonium par uréolyse et le milieu prend une teinte violette.

A ces réactions biochimiques vient s'ajouter la classique recherche de l'indol. Signalons deux points de technique assez récents. L'un, indiqué par GORE, consiste à remplacer le coton cardé qui obture un tube

de culture ayant poussé, par un bouchon de coton hydrophile traité au préalable par V à VI Gouttes de chacun des réactifs d'Ehrlich. 15 à 30' de bain-marie suffisent alors, quelque soit le milieu utilisé, pour que le coton prenne une teinte rouge en cas de réaction positive.

L'autre technique utilise la gélose semi-solide de TITTSLER et SANDHOLZER, qui a servie à l'étude de la mobilité du germe. On ajoûte directement à ce milieu, qui ne contient pas d'extrait de viande, le réactif habituel de la recherche de l'indol. La diffusion est suffisante pour permettre l'apparition de la teinte rouge caractéristique comme dans un milieu liquide.

Des variantes comparables aux milieux sucrés que nous venons d'étudier ont été mises au point. Elles font appel aux différentes propriétés des germes à identifier : Fermentation des sucres (KENDALL et RYAN : saccharose et mannite), (FELSENFELD et YOUNG : lactose et saccharose, plus salicine) (27). Utilisation du citrate de soude (SIMMONS), et du tartrate de soude (gélose au d. tartrate).

Bien qu'un seul tube de culture soit plus commode à manier que trois, la préparation de ces milieux n'est pas très simple, car nous n'avons pas encore en France de produits déshydratés en abondance.

Pour apprendre à les lire correctement, et plus tard pour les contrôler, il ne faut pas négliger l'emploi de la classique « galerie ». La plus simple comprend deux

tubes B de Besson, au glucose et au lactose, un gélose au plomb, une eau peptonée et une gélose simple. On y ajoutera secondairement les géloses sucrées indispensables.

L'identification biochimique dispose ainsi d'un équipement complet, commode et précis.

3. Etude sérologique

La nécessité de l'identification sérologique n'est plus à affirmer, elle est devenue l'étape indispensable qui confirme l'indication d'espèce fournie par la biochimie.

On pratique en général l'agglutination sur lames ; sa technique est trop connue pour que nous la rappelions. Nous ne préciserons que deux points : A partir de quel milieu de culture opérer, et comment conduire la recherche.

Pour l'identification du bacille typhique provenant de l'eau, le bactériologiste n'aura pas intérêt à pratiquer une étude sérologique précoce à partir des milieux d'isolement. Ils ne sont en général guère favorables à la conservation du pouvoir agglutinant des germes. L'expérience a montré que l'on pouvait par contre prélever la culture sur les milieux d'identification à deux sucres, comme celui de HAJNA.

Mais nous avons signalé la fréquence avec laquelle le bacille d'Eberth, pendant son séjour dans l'eau, perd momentanément ses propriétés sérologiques et ne les récupère qu'après passage sur un milieu favorable.

Aussi en pratique, se trouvera-t-on bien d'utiliser la simple gélose nutritive que l'on aura adjointe à la galerie d'identification biochimique.

La recherche sera conduite en fonction des résultats de la biochimie.

Si on a une simple indication de genre, on peut utiliser des sérums polyvalents.

Le plus souvent, l'espèce est précisée, ce qui permet l'emploi direct de sérums monovalents : anti-Eberth, antipara A, antipara B, etc...

La valeur d'une aglutination du type O, plus difficile à lire, est aussi plus discutée que celle de l'agglutination du type H.

Enfin, l'étude sérologique sera terminée par une classification antigénique. Il est à l'heure actuelle, facile de se procurer des sérums contenant à l'état pur, les différents facteurs, en particulier : IX (O) et d (H) pour le bacille d'Eberth.

On y ajoutera utilement l'étude du facteur Vi. (Brisou 9, Bonnefoi et Madame Grabar 7, Roland 76).

4. Identification par le bactériophage

Les travaux de Craigie et Yen ont montré que les souches de bacilles d'Eberth peuvent être classées d'une façon très précise selon leur sensibilité à des bactériophages anti Vi, de type spécifique.

De nombreuses recherches ont amplement confirmé cette constatation et l'ont étendue au bacille para B (FÉLIX 25).

Pour nous, l'intérêt essentiel de cette méthode et d'ajouter un caractère très personnel au bacille d'Eberth mis en cause dans telle ou telle épidémie. Les enquêtes systématiques en Grande-Bretagne et dans le Common Wealth en ont montré l'utilité dans la surveillance de l'hygiène publique, dans la conduite des enquêtes au cours des épidémies ambulatoires et la recherche des porteurs de germes responsables. Il est évident que le bacille typhique extrait de l'eau est aussi intéressant à cet égard que celui provenant du sang ou des selles d'un malade.

Pour l'instant, il n'est pas question de recommander à des laboratoires isolés l'usage de cette technique qui exige un matériel trop complexe (souches de référence, cultures de bactériophages). Mais nous pouvons souhaiter que, comme l'Emergency Public Health Laboratory Service en Angleterre, un laboratoire central groupe en France les diverses souches isolées par les laboratoires d'hygiène ou les laboratoires privés pour les classer.

Cette étude nous a montré les diverses méthodes d'enrichissement, d'isolement et d'identification dont nous pouvons disposer. Leur emploi nécessite quelques précautions et doit être coordonné. Aussi allons-nous indiquer ce qui semble actuellement la meilleure méthode de mise en évidence du bacille d'Eberth dans l'eau.

II. — METHODE PROPOSEE

Les nombreux milieux qui peuvent être utilisés dans la recherche du bacille typhique dans l'eau ont été le plus souvent l'objet d'études fragmentaires. Mais certains auteurs ont établi un protocole d'analyse complète.

La méthode de DIENERT et GUILLERD comporte : Concentration par l'alumine, enrichissement sur bouillon au vert malachite et isolement sur gélose au plomb. Si la première étape reste excellente, les deux autres, nous l'avons vu, sont nettement dépassées dans les milieux modernes.

WILSON et les nombreux auteurs que nous avons déjà cités à propos du milieu solide de WILSON et BLAIR conduisent la recherche avec une précipitation par l'alumine, un enrichissement sur milieu liquide de WILSON et un isolement sur gélose au sulfite de bismuth.

Dans cet ensemble, le milieu liquide d'enrichissement doit être remplacé par d'autres bouillons plus sensibles et plus efficaces (sélénite) et de plus la technique a besoin d'être complétée.

WEINBERG, qui préconise une filtration suivie d'enrichissement et d'isolement sur les milieux proposés par KAUFFMANN présente aussi une méthode intéressante quoique susceptible d'améliorations.

Cette notion d'analyse conduite en plusieurs temps successifs reste valable quelque soit le technique employée. Mais, parmi ces techniques, certaines sont

dépassées et doivent être remplacées de façon à composer un protocole qui bénéficie des progrès les plus récents qu nous connaissons.

A) Pour la concentration avant enrichissement, nous avons le choix entre la filtration sur terre d'infusoire ou membrane au collodion et la précipitation par l'alumine.

La filtration est simple, facile à exécuter ; elle évite le maximum de traumatismes aux bacilles, mais elle n'a d'intérêt que si le filtrat est repris sans transport comme dans l'appareil de WEINBERG. La membrane au collodion est évidemment supérieure à la terre d'infusoire, mais elle n'a pas encore été adaptée d'une façon assez simple.

La précipitation par l'alumine est très efficace. Mais nous avons vu qu'elle exige un assez gros matériel, à moins que l'on n'utilise la reprise directe du dépôt par un milieu d'enrichissement.

B. - Pour l'enrichissement direct, qui évite au maximum les manipulations et permet la culture du bacille d'Eberth dans l'eau même où on le recherche, les milieux concentrés du type SZPERS ou SUCKLING sont onéreux et difficiles à préparer. Par contre, le bouillon au sélénite est d'un emploi facile et efficace.

C. - Pour l'isolement, nous avons retenu surtout comme les plus employés et les plus efficaces, le milieu de WILSON et BLAIR, la gélose S.S., le milieu E.M.B., et la gélose au vert brillant modifiée par KAUFFMANN.

Le laboratoire chargé de la recherche du bacille typhique dans l'eau, ne peut baser la réponse qu'il va donner que sur un ensemble de techniques complexes. En effet, aucune des méthodes que nous venons d'exposer n'est valable isolée. Il faut les mener parallèlement pour être certain d'obtenir un résultat intéressant.

Technique de la méthode proposée.

A) LE PRELEVEMENT

Il doit être fait avec les précautions d'usage (flacons stériles de un litre). La quantité minimum à exiger est de 2 litres, mais au-dessus la masse du produit devient trop encombrante sans augmenter beaucoup l'efficacité de la recherche.

Le transport en caisses garnies de glace sera réalisé par les procédés habituels.

B) ENRICHISSEMENT

Chaque litre est traité séparément.

1° Le premier litre subit une concentration par l'alumine. Le dépôt centrifugé ou repris directement dans le ballon est ensemencé sur bouillon au tétrathionate.

2° Le deuxième litre est directement additionné de milieu au sélénite concentré.

C) ISOLEMENT

1° Le bouillon au tétrathionate est repiqué après 18 à 24 heures à 37° sur gélose S.S. et sur gélose au vert brillant modifiée par KAUFFMANN.

2° Le bouillon au sélénite est repiqué sur gélose S.S. et sur une gélose solide de WILSON et BLAIR.

Trois cas peuvent se présenter :

a) Sur les quatre milieux, après 48 heures d'étuve, aucune colonie obtenue n'est suspecte. La recherche est négative et ne peut être poussée plus avant.

b) Sur un ou plusieurs des quatre milieux de sélection, un groupe de colonies mal isolées paraît suspect. Pour obtenir des colonies identifiables, parfaire l'isolement par passage sur milieu E.M.B.

c) Sur un ou plusieurs des quatre milieux de sélection des colonies bien isolées sont nettement suspectes.

Toute colonie isolée suspecte doit être soumise à la même identification.

D) IDENTIFICATION

Ensemencer en séparation chaque colonie suspecte sur un milieu ordinaire solide. (Gélose simple, gélose lactosée tournesolée) que l'on laisse 18 à 24 heures à l'étuve.

Le but de ce retard volontaire, qui n'a pas dans l'examen de l'eau l'importance qu'il prendrait pour une recherche clinique, est double.

Permettre d'obtenir des colonies plus pures, mieux isolées, et plus importantes en volume, donc plus faciles à étudier.

Permettre aussi aux germes de reprendre toutes ses

propriétés biochimiques et sérologiques qui le feront identifier d'une façon certaine.

Après ce passage, une des grosses colonies isolées sera soumise :

1. — *A l'examen morphologique.*

Coloration de gram.

Etude de la mobilité (examen direct et ensemencement d'un tube de gélose molle de TITTSLER et SANDHOLZER qui servira après lecture à la recherche de l'indol.

2. — *A l'examen biochimique.*

Ensemencement sur un tube de milieu de KLIGER ou de HAJNA qui ont remplacé la galerie classique à laquelle il faudra parfois revenir. Le test à l'urée d'Anderson pour éliminer le Proteus est rendu en général inutile par le passage sur gélose ordinaire où le germe reprend ses caractères de mobilité.

3. — *A l'examen sérologique.*

Faire une agglutination sur lames, avec un sérum anti-Eberth (H + O).

L'étude sérologique sera complétée au besoin par la recherche des facteurs antigéniques dissociés, soit sur la colonie dont on dispose, soit après 24 heures d'étude sur un nouveau repiquage.

Les auteurs anglais terminent l'identification en adressant la souche au laboratoire spécialisé dans l'étude de la classification par le bactériophage.

L'analyse complète demande à partir du moment où l'eau arrive au laboratoire un temps minimum de quatre jours, mais souvent de 6 à 7 jours.

Cette technique peut paraître longue et complexe. Mais le temps ne compte pratiquemnt pas pour une analyse d'eau et il est absolument nécessaire, nous l'avons vu, de multiplier les moyens de recherche.

La méthode que nous proposons s'applique à l'eau d'alimentation.

Pour l'eau d'égout, la technique est sensiblement la même. On peut cependant supprimer le temps de concentration par l'alumine et enrichir directement 20 à 30 cc. de cette eau en l'ensemençant sur milieu au sélénite ou sur bouillon au tétra-thionate de KAUFFMANN.

Nous allons voir que la complexité technique des méthodes bactériologiques n'est pas le seul obstacle à la recherche du bacille typhique dans l'eau d'alimentation.

III. — OBSTACLES RENCONTRES

De nombreuses objections ont été adressées à la recherche du bacille typhique dans l'eau. Les difficultés que rencontre le chercheur sont de trois ordres :

Les premières tiennent aux conditions mêmes d'existence du bacille d'Eberth.

Les secondes sont basées sur la critique des méthodes.

Les troisièmes sur les conditions épidémiologiques.

A) Vitalité du bacille d'Eberth dans l'eau

La question qui se pose encore aux bactériologistes est de savoir si l'eau constitue pour ce germe un milieu de culture ou un simple agent vecteur.

Il ne faut pas oublier que chaque eau a des caractéristiques qui varient selon son origine géologique, son parcours. L'heure, la saison, les modifient. Ainsi l'eau n'offre jamais les mêmes conditions d'existence aux germes qu'elle contient.

Les facteurs nettement défavorables à la persistance du bacille d'Eberth dans l'eau sont : la chaleur, l'exposition aux rayons solaires, une trop forte teneur de l'eau en oxygène (eau aérée), un pH trop écarté de la normale (eau dure par exemple) et la présence de bactériophage.

Par contre, le bacille résiste assez bien au froid et est assez peu sensible aux variations de la composition chimique. On sait moins bien comment il réagit à la présence d'autres germes. Pour MIHAELOFF (62), c'est un facteur négligeable.

Pour beaucoup d'autres auteurs la concurrence microbienne aurait une grande importance.

Pratiquement, l'eau est un mauvais milieu de culture pour le bacille typhique. Les eaux courantes, aérées, exposées à la lumière et contenant des bactériophages réalisent au maximum leur auto-épuration.

Exceptionnellement, certaines eaux stagnantes dans l'obscurité, de température assez stable et basse (puits,

résrvoirs) peuvent offrir des conditions suffisamment favorables pour permettre sinon une pullulation, du moins une conservation du germe.

L'été est donc la saison la moins propice à la conservation du bacille typhique (chaleur, soleil) et on isole les germes des eaux de surface beaucoup moins facilement qu'en hiver (RUYS 84). Il est d'ailleurs assez curieux de noter que la fréquence des épidémies est dans l'ordre inverse : C'est, estime RUYS, qu'en été le rôle joué par l'eau de surface est moindre que celui joué par les eaux profondes.

Des expériences déjà anciennes avaient montré la variabilité de la résistance du bacille d'Eberth dans l'eau et permis de chiffrer la durée de sa conservation.

HOCHSTELLER (1887), HUFFOC (1887) et STRAUSS et DUBARRY (1899), plus tard VINCENT, utilisant des méthodes différentes, trouvent des délais variant de 5 jours à 3 mois selon la qualité de l'eau examinée.

Pour CHANTEMESSE et FRANKLAND (30), la durée de longévité ne dépase guère trente jours.

JORDAN, RUSSEL et ZEIT (43) sont sensiblement du même avis.

A l'heure actuelle, SUCKLING (97) et ROCHAIX (75) estiment que le bacille typhique peut vivre dans l'eau de 4 jours pour les cas les moins favorables à 70 jours environ, le nombre total de bacilles allant régulièrement en décroissant. (HENKELEKIAN, 36, RUCHHOFT, 81).

Les variations de cette résistance sont si notables qu'elles ont inspiré à VIOLLE et FICKER (104) une méthode de contrôle de l'eau, basée sur ce qu'ils ont appelé « l'indice typhogène ».

La technique consiste à ensemencer dans 10 cc. d'eau suspecte 0,1 cc. d'une émulsion de bacilles typhiques à 100.000 bacilles par cc. On met à l'étuve à 37° et, deux fois par jour pendant quatre jours, on prélève 0,1 du mélange que l'on ensemence sur eau peptonée avec un papier à l'acétate de plomb. Après 48 heures d'étuve, le noircissement du papier indique la présence du bacille d'Eberth.

Un témoin (eau peptonée ensemencée avec 0,1 d'eau à examiner) ne doit pas donner de SH_2.

L'indice typhogène est alors défini : « la durée exprimée en heures de la persistance du bacille typhique dans une eau à 37° ».

Cet indice est maximum (4 jours) pour l'eau stérile, et minimum pour une eau naturelle défavorable (quelques heures). Les auteurs justifient l'application de leur méthode, en indiquent les limites et en fixent l'utilisation et l'interprétation (104).

L'indice typhogène confirme la variabilité de la résistance de l'Eberth en fonction des conditions physiques et bactériologiques offertes par l'eau, la durée de cette résistance étant en général assez courte.

B) Importance de la méthode employée

Les techniques de recherche des bacilles typhiques dans l'eau ont fait l'objet en tous temps d'assez violentes critiques, surtout tant que la séparation Coli-Salmonella était assez incertaine.

Avec les techniques actuelles aussi complètes que celles que nous avons indiquées, il est très possible de mettre en évidence le bacille d'Eberth dans l'eau.

Nous avons vu que la plupart des procédés permettent de trouver un bacille à condition que la concentration soit au moins de 20 bacilles par litre. De même, dans un eau souillée expérimentalement (HOUSTON 41) on ne retrouve que le vingtième environ des germes qui ont été ajoutés.

D'autre part, la complexité des méthodes offre facilement prise à la critique.

Pour avoir un résultat, qui sera toujours au-dessous de la réalité (perte de bacilles) une grande dépense de temps et de matériel est indispensable.

C) Arguments épidémiologiques

Presque tous les auteurs ont insisté sur les mauvaises conditions épidémiologiques dans lesquelles se place la recherche du bacille typhique dans l'eau.

Supposons qu'une eau soit polluée par un porteur de germes. Un individu consomme cette eau. Dix à quinze jours d'incubation au moins s'écouleront avant que ne se déclenche la fièvre typhoïde.

Un autre délai est nécessaire pour que la maladie soit diagnostiquée, déclarée et que l'organisme de santé intéressé soit en possession des renseignements permettant la mise en route d'une enquête épidémiologique.

En admettant même que le prélèvement soit effectué sans retard (c'est-à-dire que l'enquête ait mis aussitôt en évidence la nappe, le puit ou la source responsables), trente à quarante jours se seront écoulés entre l'instant où la pollution de l'eau était indiscutable et le moment de l'examen. Il y a de fortes chances pour que pendant ce temps le bacille typhique ne soit plus présent dans l'eau.

C'est là un des plus graves obstacles rencontrés, d'autant plus grave qu'il ne peut être réduit au-delà de certaines limites. Même si nous pouvons accélérer au maximum la marche de l'enquête, il n'est pas en notre pouvoir de modifier les délais d'incubation de la fièvre typhoïde.

En induire qu'il est absolument impossible de retrouver le bacille typhique responsable dans une eau incriminée, est cependant exagéré.

En effet, dans les circonstances les plus défavorables (pollution unique d'une eau réalisant une auto-épuration rapide), il est évident que le bacille ne pourra être retrouvé. Mais il est aussi vraisemblable qu'une épidémie importante ne pourra pas se développer.

Dans le cas contraire, le porteur de germes responsable continue à souiller l'eau jusqu'au moment où l'en-

quête épidémiologique provoque le prélèvement : les chances de retrouver le bacille typhique sont réelles.

Entre ces deux cas extrêmes, les circonstances peuvent être extrêmement variables (pollutions intermittentes, épuration plus ou moins rapide de l'eau). Les chances de retrouver le bacille sont alors discutables et relativement imprévisibles, et peuvent dépendre beaucoup de la méthode mise en œuvre.

L'idée dominante qui se dégage de l'étude de ces obstacles est la fréquence des cas d'espèces. Il est à peu près impossible de déduire des données expérimentales une doctrine absolue aussi bien positive que négative. On peut simplement dire ceci :

Par un travail patient et minutieux, il est possible d'isoler le bacille typhique de l'eau, mais même avec la technique la plus rigoureuse, on ne le retrouvera pas toujours, les échecs étant plus nombreux que les réussites.

ETUDE PRATIQUE D'UNE EPIDEMIE

Les faits que nous allons relater maintenant se situent entre le 1er janvier 1947 et le mois de juin de la même année. Ils ont pour cadre une commune rurale du département de la Haute-Garonne, à une trentaine de kilomètre de Toulouse.

1.800 habitants y sont groupés autour d'un chef-lieu de canton dont l'alimentation en eau était assurée par des puits situés en pleine agglomération, non protégés par des aires étanches et dépendant tous d'une nappe phréatique qui s'étend sous le village.

Le 1er janvier, un cas de fièvre typhoïde bénigne se déclare. Il s'agit de Monsieur L..., 40 ans, vacciné en 1927 et obligé par sa profession à de fréquents déplacements (foires, marchés), ce qui fait poser l'origine exogène de cette affection. L'hémoculture tardive est négative. Le séro-diagnostic est douteux. Au demeurant, la guérison est rapide.

La déclaration obligatoire a été faite, l'hospitalisation jugée superflue et toutes garanties d'isolement et de désinfection sont données. Tout rentre dans l'ordre, semble-t-il, et les semaines qui suivent n'apportent aucun fait nouveau.

Brusquement en quatre jours, cinq cas de fièvre typhoïde se déclarent : une femme de 38 ans et quatre enfants de 9 ans, 10 ans, 11 ans et 14 ans, dont la fille de Monsieur L..., bientôt suivie six jours plus tard par sa sœur, âgée de 15 ans. Ces cas se situent entre le 29 mars et le 6 avril.

Le 8 avril, ignorant encore tout des faits, le laboratoire de bactériologie et d'hygiène de la Faculté effectue sur l'eau de trois puits de l'agglomération un examen bactériologique selon les méthodes normales. Les résultats se chiffrent par 1.000 à 1.500 colibacilles au litre, et une liquéfaction complète en 48 heures des plaques de gélatine.

Le 14 avril, nous prenons connaissance de la première enquête épidémiologique effectuée par la Direction départementale de la Santé de Toulouse. Elle nous apprend tous les événements que nous avons relaté jusqu'à présent et que nous avons rétabli ici dans l'ordre chronologique.

Le rapport nous indique qu'il y a à ce jour au total, 8 cas de fièvre typhoïde que le séro-diagnostic indique tous comme étant dus au bacille d'Eberth.

Il nous affirme de plus l'origine hydrique probable de cette épidémie, le responsable initial semblant être M. L... agissant comme porteur de germes. En effet, son seau de toilette est vidé au ruisseau et rincé au puits communal sans avoir été désinfecté.

Le 16 avril, on effectue au laboratoire une première tentative de recherche de bacille typhique dans le puits du foirail dont l'eau a été bue par tous les malades. La tentative reste vaine, l'isolement ne montrant aucune colonie de germes pathogènes. Au demeurant cette eau contient 1.500 colibacilles par litre (20 avril).

Nous décidons alors de recommencer la recherche ; un nouveau prélèvement est demandé. Il nous parvient le 22, et nous le traitons avec le maximum de soins : Précipitation à l'alumine, suivie d'enrichissement sur bouillon au sélénite et isolement sur gélose S.S. et milieu E.M.B.

Une Salmonella pousse : nous pensons avoir réussi mais à l'identification, quelle n'est pas notre surprise de voir qu'il s'agit d'un germe du groupe para B. d'après ses réactions biochimiques. (Milieu de HAJNA modifié, doublé par la galerie classique avec tubes de Besson). Cependant, ce germe n'est pas agglutiné par le sérum antipara B, même après passage sur gélose simple. Les essais d'agglutination avec un sérum anti C, un un sérum anti Gaertner et un sérum anti Aertrycke ne donnent pas plus de résultats.

Sur le moment, ce résultat nous étonne et nous fait supposer que l'épidémie pourrait bien avoir un autre

germe que le bacille d'Eberth comme origine. Mais cette pensée est rapidement infirmée par d'autres examens.

En effet, plusieurs malades ont été hospitalisés à l'hôpital de Purpan, ce qui nous vaut des recherches à exécuter.

Plusieurs examens de selles, en particulier celles de Monsieur L..., responsable initial de l'épidémie, nous montrent un bacille d'Eberth caractéristique.

Une des enfants, la petite N. L... meurt, de complications abdominales graves. La culture de la bile prélevée au cours de l'opération et celle du pus péritonéal nous montrent encore un bacille d'Eberth à l'état pur.

Nous voudrions à ce moment (26 avril) effectuer à nouveau une recherche de bacilles typhiques dans l'eau, mais de sévères mesures ont été prises par la Direction départementale de la Santé : les puits du centre de l'agglomération et celui du foirail en particulier, sont asséchés et curés.

Un dernier cas de typhoïde se déclare fin avril, cas de contagion familiale, chez la mère d'un des enfants non hospitalisés. Cette femme, Madame J..., fait une forme grave de fièvre typhoïde qui nécessite son hospitalisation à Purpan.

Un séro-diagnostic pratiqué est nettement positif au bacille d'Eberth. Mais un examen de selles (le 12 mai) met en évidence au lieu du bacille typhique attendu, un germe du groupe para B, inagglutinable par les

sérums anti B, anti C, anti Gaertner et anti Aertrycke, semblable en apparence à celui que nous avions extrait de l'eau.

Un essai de classification antigénique ne fait apparaître qu'une formule assez pauvre g. m. (H.), en utilisant les sérums que nous possédons.

Le doute réveillé à nouveau par cet examen est rapidement dissipé, car Madame J... présentant un kyste de l'ovaire suppuré, est opérée et le pus de ce kyste se révèle comme une culture pure de bacilles d'Eberth.

Aux mois de mai, juin, juillet, des examens de selles montreront que Monsieur L... et une de ses filles sont encore des porteurs de bacilles d'Eberth, mais par intermittence seulement.

Le déroulement de cette épidémie, assez restreinte au demeurant, appelle pourtant de nombreux commentaires, car il réunit les éléments d'une démonstration.

Des notions classiques s'y rencontrent : Porteur de germes à qui l'on n'a pu faire admettre la nécessité de la désinfection et de l'isolement, alerte donnée trop tard aux organismes compétents d'Hygiène, déclanchement brutal de l'épidémie, existence de complications, et enfin arrêt total de l'infection par des mesures énergiques. L'hygiène, l'épidémiologie et même la clinique y ont leur place.

Le laboratoire aussi dont les examens répétés de produits pathologiques fixent à plusieurs reprises sans hésitation le germe causal.

La confirmation absolue de l'origine hydrique de l'épidémie demandait l'isolement du bacille typhique dans l'eau du puits incriminé.

Cette recherche nous a été demandée deux fois avant l'assèchement du puits. Nous l'avons conduite par la méthode que nous avons exposée sans obtenir jamais un bacille d'Eberth.

Le seul germe du groupe Salmonella que nous ayons rencontré dans l'une des analyses s'est révélé à l'identification biologique et sérologique comme un bacille du groupe para B, inagglutinable par les sérums courants anti B, C, Gaertner, Aertrycke. Il fait donc partie de ces germes difficiles à identifier avec les moyens dont nous disposons, rencontrés partout dès qu'une souillure fécale humaine ou animale est possible.

Bien que nous ayons rencontré un germe comparable dans les selles d'une des malades, nous n'avons pas retenu cette coïncidence bactériologique de minime importance dans cette petite épidémie où le bacille d'Eberth a été constamment rencontré.

La cause de notre échec ne semble pas dépendre de la méthode que nous avons employée puisqu'elle nous a permis l'isolement d'un germe du groupe Salmonella.

Le premier facteur qui pouvait nous être défavorable était la grande pollution de l'eau où jouait au maximum la concurrence microbienne. Le deuxième, beaucoup plus important, est le facteur temps.

L'épidémie éclate le 29 mars et dure jusqu'au 9 avril, ce qui fait remonter la contamination primitive à une date antérieure d'au moins deux semaines (14 au 24 mars).

Nos recherches datent du 22 et 26 avril. Elles sont donc postérieures d'un mois aux contaminations de l'eau, probablement dues au porteur de germes, Monsieur L..., porteur intermittent comme nous l'ont révélé ses examens de selles.

On peut supposer qu'à la mi-mars, Monsieur L... a contaminé l'eau par une décharge bacillifère qui provoque l'épidémie. Le nombre de germes allant dès cette époque en diminuant, nous n'avons pu les retrouver dans l'eau un mois plus tard.

UTILISATION PRATIQUE DE LA RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE DANS L'EAU

La recherche du bacille typhique dans l'eau entre dans le cadre de deux études différentes.

L'examen bactériologique de l'eau.

L'étude épidémiologique de la fièvre typhoïde.

I. — EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DE L'EAU

Pour cet examen, on dispose à l'heure actuelle des techniques suivantes :

Numération des germes sur plaque de gélatine.

Recherche et numération du colibacille.

Recherche des anaérobies.

Recherche des steptocoques fécaux.

Recherche des bactéries intestinales pathogènes.

Bacilles typhiques et para-typhiques.
Bacilles dyssentériques.
Vibrion cholérique.
Examen de l'eau par les bactériophages spécifiques.
Evaluation de l'indice typhogène.

Ces méthodes doivent répondre à deux nécessités :

A. — Contrôle systématique d'une eau d'alimentation habituellement utilisée.

B. — Etude complète d'une adduction d'eau nouvelle.

Nous allons étudier, dans ces deux éventualités l'emploi que font les bactériologistes, de la recherche du bacille typhique.

A) Contrôle d'une eau

« Pour connaître parfaitement une eau, dit Imbeaux (45), il faut déterminer à des époques très rapprochées, le nombre, la nature et la signification des bactéries qu'on y trouve ».

Ceci est pratiquement irréalisable, pour des raisons techniques de temps et de matériel. Aussi l'hygiéniste demande simplement au bactériologiste un moyen simple et efficace de détecter une eau souillée par des bactéries pathogènes et donc susceptible de provoquer une épidémie.

Voyons rapidement dans différents pays, comment ce problème est résolu à l'heure actuelle.

Aux U.S.A., on utilise surtout le « Test Coli ». Quelques critiques ont été formulées à son égard. Ainsi, par exemple, en 1941, la Haute Cour de l'Illinois (37) nie la valeur absolue du colibacille utilisé comme test de pollution de l'eau.

Ces critiques ont eu pour conséquence de nombreux travaux tendant à perfectionner la technique de la numération et de l'identification du colibacille, et surtout l'interprétation de sa présence en fonction de ses rapports avec les bactéries pathogènes intestinales. (KEHR et BUTERFIELD 50).

La méthode courante, quasi officielle, nous est indiquée par les « Standard Methods of Examination of Water » publiées par l'American Public Health Association. Dans la huitième édition, il est encore question de la recherche du bacille typhique. En 1945, COLEMAN y consacre une étude (92).

Mais dans la neuvième édition, tout l'examen repose sur l'identification précise du colibacille dont on détermine le Most Probable Number (M.P.N.) et l'origine fécale ou ubiquitaire (cette distinction semblant d'ailleurs d'un intérêt plus dogmatique que pratique).

Le test Coli est doublé par la recherche du streptocoque fécal et par celle du Clostridium Welchii et par la numération des germes sur plaque de gélatine.

La recherche du bacille typhique n'est plus mentionnée. (53).

En Grande-Bretagne, où nous l'avons vu, de nombreuses études ont été conduites au sujet de la présence du bacille typhique dans l'eau, cette recherche est complètement abandonnée. (73).

Les méthodes de contrôle bactériologique sont presque identiques à celles utilisées aux U.S.A. On le désigne, habituellement sous le terme de « Methodes Standard Anglo-Américains ». (44)

Dans la plupart des pays de l'Europe continentale, on utilise également le test Coli, avec des techniques variables selon les écoles. (54)

En France, le contrôle de la potabilité de l'eau par la recherche du colibacille est régulièrement effectué dans les Laboratoires d'Hygiène Publique.

Mais, devant la divergence des techniques employées, certains bactériologistes souhaitent leur rationalisation (HAUDUROY, 35 et ROCHAIX, 75).

Certains préconisent d'autre part l'emploi des méthodes standard anglo-américaines (HAUDUROY 35, IMBEAUX, 44, BRISOU, 9, BOLZINGER et BONNET).

L'étude de la signification des streptocoques et des entérocoques, la recherche des anaérobies (ESQUIROL 24) complètent l'examen bactériologique des eaux d'alimentation.

En pratique, nous le voyons, la recherche du bacille typhique n'est pas employée dans le contrôle bactériologique de l'eau.

Cette conclusion ne doit pas surprendre. Malgré ses relatives difficultés d'exécution et d'interprétation, la mise en évidence du colibacille dans l'eau est à l'heure actuelle, beaucoup plus simple et beaucoup plus efficace que la longue et aléatoire recherche du bacille d'Eberth. Elle correspond davantage aux nécessités du contrôle systématique de l'eau.

De même, si l'on désire doubler le test Coli par un autre examen bactériologique, la recherche du streptocoque fécal, celle des anaérobies ou même l'évaluation de l'indice typhogène sont d'un emploi beaucoup plus commode que la mise en évidence du bacille typhique.

La recherche du bacille d'Eberth ne peut donc être utilisée, et c'est là une opinion unanime, comme test de surveillance habituelle d'une eau d'alimentation.

B) **Etude d'une nouvelle adduction**

Lorsque on entreprend l'étude complète d'une eau non encore utilisée pour les besoins de l'alimentation, on a recours à un ensemble complexe d'examens qui se traduisent par des rapports administratifs, des études géologiques, géographiques, chimiques et bactériologiques.

La notion de temps ou de simplicité n'a pas, dans cette vaste étude, la même importance que dans le contrôle systématique de l'eau.

Au contraire, dans l'examen bactériologique, la recherche des bacilles typhiques et paratyphiques pour-

ra occuper une place intéressante. Plusieurs bactériologistes et hygiénistes ont exprimé cette opinion (ROCHAIX 75, SUCKLING 97, Institut d'Hygiène de la Société des Nations 89 (1945).

II. — ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES DES FIEVRES TYPHOIDES

La recherche du bacille typhique dans l'eau n'apporte aucune aide appréciable au diagnostic bactériologique et clinique de la fièvre typhoïde. L'hémoculture, la coproculture, la médulloculture et le séro-diagnostic y suffisent largement.

Par contre, les enquêtes épidémiologiques concernant les fièvres typhoïdes peuvent bénéficier de cette recherche. (59).

En effet, la mise en évidence d'un bacille typhique dans une eau que l'enquête aura permis de considérer comme suspecte permettra d'affirmer et de préciser l'origine hydrique d'une épidémie.

D'autre part, l'identification du bacille typhique isolé est réalisé avec une grande précision si l'on a recours à la classification par les bactériophages. Dans ces conditions, il est intéressant de pouvoir comparer le bacille isolé chez le porteur de germes, celui extrait du sang ou des selles d'un malade et celui que l'on aura pu mettre en évidence dans l'eau.

L'identité de race de ces trois bacilles permettra de concevoir le schéma de l'épidémie avec une grande netteté.

Enfin il peut être intéressant de rechercher les bacilles typhiques dans une eau qui a provoqué récemment une épidémie. Dans certains cas, l'épidémie une fois éteinte et les habitants vaccinés, on pourra être obligé d'utiliser la même eau déjà tenue pour responsable, faute de pouvoir avoir recours à une adduction nouvelle. Avant d'employer cette eau, même soumise à une désinfection élémentaire, on aura intérêt à vérifier non seulement sa teneur en colibacilles, mais encore l'absence totale de bactéries pathogènes (bacilles typhiques ou paratyphiques, selon le cas), leur persistance obligeant à des mesures supplémentaires.

En résumé, l'étude bactériologique d'une eau dans le courant d'une épidémie de fièvre typhoïde pourra, en utilisant la recherche du bacille typhique, être d'un intérêt certain, à condition cependant que cette recherche ne soit pas effectuée trop tardivement, ce qui est, nous l'avons vu, souvent difficile.

CONCLUSION

Cette étude nous a montré que la recherche du bacille typhique dans l'eau d'alimentation était possible, en utilisant un ensemble complet de techniques analogue au protocole de recherche que nous avons indiqué.

Mais nous avons vu que ces méthodes étaient longues et complexes. La faible teneur de l'eau en bacilles d'Eberth et les conditions épidemiologiques défavorables contribuent, d'autre part, à rendre cette recherche aléatoire.

En raison de ces difficultés, le « test coli » en général, et, en particulier, les méthodes standard anglo-américaines ont remplacé la recherche du bacille typhique pour le contrôle bactériologique habituel d'une eau, et tendent même à lui être substitué en toutes occasions.

Cependant, pour des Laboratoires disposant d'un matériel suffisant pour mener à bien l'isolement et l'identification d'un bacille typhique, il est utile et intéressant d'entreprendre cette recherche :

soit au cours de l'examen complet d'une adduction d'eau nouvelle,

soit surtout, au cours d'une épidémie de fièvre typhoïde d'origine hydrique.

A l'heure actuelle, les difficultés techniques bornent à ces cas l'utilisation de la recherche du bacille typhique dans l'eau. Seule, la découverte d'un procédé bactériologique qui permettrait d'affirmer avec simplicité, rapidité et précision, la présence d'un bacille d'Eberth dans une eau quelconque, sera susceptible de donner un intérêt hygiénique et épidémiologique accru à cette recherche.

VU :	VU :
Le Président de Thèse,	*Le Doyen,*
ANDRIEU	CALVET

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 20 Mars 1948

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :
DOTTIN

BIBLIOGRAPHIE

Nous renvoyons pour la bibliographie générale aux grands traités classiques.

BESSON. — Technique microbiologique et sérothérapique.

CALMETTE, NÈGRE et BOCQUET. — Manuel technique de Microbiologie et de Sérologie.

DOPTER et SACQUEPÉE. — Bactériologie expérimentale.

HAUDUROY. — Dictionnaire des bactéries pathogènes.

HAUDUROY. — Microbiologie générale et technique microbiologique.

PHILIBERT et GASTINEL. — Microbiologie.

NATTAN-LARRIER. — Traité de Microbiologie (T. II).

E. M. C. — T. Maladies infectieuses ; Article : Typhoïde.

Nous ne mentionnerons ici que les publications que nous avons consultées.

1. ALTSCHULLER. — Eine Typhus anreicherungs methode. (*Central Blatt. f. Bakt* 1903. T. XXXIII, N° 9, p. 741).

2. ANDERSON (T.-G.). — Sur une uréase des Protéus. (*Science* 1945. T. CI, p. 470).

3. *Annual Report of the chief medical officer of the Great Britain Ministry of Health* (1931, p. 52 ; 1933, p. 46).

4. BELONOWSKY. — Mise en évidence des bacilles typhiques dans l'eau par la séro-agglutination. (*Roussky Vratch* 1914, N° 1, p. 18) reproduit dans (*Revue de l'Off. Inter. d'Hyg. Publ.* 1914, p. 535.

5. BERGEY. — Manual of determinative Bacteriology. Fifth edition 1938 (London).

6. BONJEAN et OGIER (I). — L'examen bactériologique de l'eau. (T. II du *Traité d'hygiène de Brouardel* (P.) *et Mosny* (E). 1906, J.B. Baillière, Paris).

7. BONNEFOY et Mme J. GRABAR. — Diagnostic biologique des affections à Salmonella. (*Annales de l'I.P.* (I et II) 1946, T. LXXII p. I) et (*Société française de Microbiologie,* 9 janvier 1947).

8. BRISOU (J.) — Fièvre typhoïde et coquillages. (*Thèse Bordeaux,* 1933).

9. BRISOU (J.) — Entérobactéries pathogènes. (Masson, Paris, 1946).

10. BROUARDEL et THOINOT. — Nouveau traité de Médecine de Brouardel et Gibert. (T. III *Fièvre typhoïde,* p. 18) (1909, Paris Baillière).

11. BUTTIAUX (R.). — Techniques modernes de coproculture. (*Annales de Biol. Clin.* 1946, N° 10, pp. 297-309).

12. CARRIEU, LISBONNE et M^me^ RAMBAULT. — Le milieu de Wilson et Blair et son emploi en Hygiène. (*Revue d'Hyg.* 1940 T. LXI, pp. 571-575.

13. CASSEDEBAT. — Le Bacille typhique et les pseudo-bacilles typhiques dans les eaux de rivière. (*Annales de l'I.P.*, 1890, n° 10, p. 625).

14. CERNOZUBOW, FILIPOVIC HERMAN et STAVEL. — Recherche des Salmonellas dans l'eau par le milieu de Wilson et Blair. (*Zeitsch. für Hyg. und Infekt. Krank.* 1944, T. CXXV. p. 493 et p. 510).

15. CHANTEMESSE. — Procédé d'isolement du Bac. typhique dans l'eau. (*C.R. de l'Ac de Méd.*) (20 mai 1902 et juin 1902).

16. CHANTEMESSE. — Fièvre typhoïde (T.I., p. 719, du *Traité de Médecine* de Charcot, Brouchard et Brissaud, Paris 1891).

17. CIAUDO (P.) — Techniques américaines de recherche des microbes pathogènes intestinaux dans les selles. (*Annales de Biol. Clin.* 1946, n° 3, p. 78).

18. CICCARELLI (M.). — Emploi de membranes filtrantes pour la recherche du bacille typhique dans l'eau. (*Traduit de Diagn. e tech. di laborat.*, 1938, T. IX, pp. 178-185.)

19. COPE et KASPER. — Cultural method for detection of carriers. (*Am. J. of Public Health.*, 1938, T. XXVIII, pp. 1065-1068.)

20. DESBORDES (J.). — Notes sur les techniques bactériologiques utilisées actuellement aux U.S.A. (*Annales de Biol. Clin.*, 1945, n° 9, p. 255.)

21. DIENERT (M.). — Alimentation en eau des villes. (T. II, p. 176. *Librairie de l'Enseignement technique ;* Paris, 1935.)

22. DIENERT et MATHIEU. — Isolement des germes typhiques et para-typhiques dans les eaux de la Seine (*C. R. de l'Acad. des Sciences,* 1917, T. CLXIV, p. 124, et 1918, T. CLXVI, p. 307.)

23. DIFCO. — *Manual of dehydrated culture media.* (Seventh edition ; 1944. Détroit, Michigan.)

24. ESQUIROL (J.). — Contribution à l'étude de la recherche des microbes anaérobies dans l'eau d'alimentation. (*Thèse Méd. Toulouse,* 1947.)

25. FÉLIX (A.). — Méthodes modernes de laboratoire dans le contrôle des fièvres typhoïdes (*Brit. Med. J., éd. française,* 1944, T. II, n° 12, p. 274.)

26. FERRAMOTA. — Wilson method for bacteriologic examination of water. (*Am. J. of Public Health.*, 1940, T. XXX, pp. 1083-1090.)

27. FELSENFELD et YOUNG. — New medium for differentiation of Salmonella and paracolon organisms. (*Am. J. of Clin. and Path. Tech. Sectio,* 1944, T. VIII, pp. 26-27.)

28. FERGUSSON (W.-J.). — Urease activity of Proteus and Salmonella organism. (*Journal of Lab. and Clin. Med.*, 1943, T. XXVIII, n° 14, p. 1715.)

29. FICKER (M.). — Ueber den Nachweis von Typhus bacillen im Wasser durch Fallung mit Eisensulfat. (*Hyg. Rundschau*, 1904, T. XIV-I, pp. 7-9.)

30. FRANKLAND. — Uber das Verhalten des typhus Bacillen und des Bact. coli un Trinkwasser. (*Zeit. für Hyg. und Inf. krankh.*, T. XIX, p. 135.)

31. GALTON (M.) et QUAM (M.-S.). — Salmonella isolés en Floride en 1943 par la méthode de Kauffmann (*AM. J. Public Health ;* 1944, T. XXXIV, pp. 1071-1075.)

32. GRAY (J.). — The isolation of bact. paratyphosum B. from sewage (*Brit. Med. J.*, 1929, p. 142.)

33. GUILLERD (A.). — Notions d'Hydrologie appliquée à l'Hygiène. Bactério. des eaux (Paris et Liège, 1927. Librairie polytechnique Ch. Béranger.)

34. HAJNA (A.-A.). — Triple sugar iron medium for identification of the Intest. group of Bact. (*J. of Bact.*, 1945, T. XLIX, p. 516.)

35. HAUDUROY (P.). — Un problème d'Hygiène irrésolu : la standardisation des méthodes d'exa-

men bactériologique de l'eau. (*Revue d'Immunologie*, 1942, T. VII, pp. 74-96.)

36. HENKELEKIAN (H.) et SCHULHOFF. — Studies on survival of B. typhosum in surface waters and sewage. (*New-Jersey Agric. Exper. Stat. Bulletin*, 1935, n° 589.)

37. HIGHT COURT rejects B. coli as indicating unsafe water. (Illinois.) (*Water works Engineering.*, 1941, T. XCIV, p. 516.)

38. HIPPE (L.). — Epidemic of Paratyphoid B. due to Salmonella Schottmülleri found in Water supply. (*Arch. cf. Hyg.*, 1938, T. CXXI, pp. 56-66.)

39. HODER. — Uber einer Methode zur elektiven Anreicherung von typhus B. aus Wassern und Stühlen. (*Central Blatt für Bakt.*, 1927, T. I, p. 313 et p. 427.)

40. HOFFMANN (W.) et FICKER (M.). — Ueber neue Methoden des Nachweises von Typhusbacillen. (*Hyg. Rundschau.* 1904, T. XIV, n° 1, pp. 1-7.) (*Arch. für Hyg.* 1904, T. XLIX, pp. 229-273.)

41. HOUSTON (A.-C.). — Studies in water supply (Voir n° 57 de 1928 à 1931, 23^{me} au 26^{me} rapport.)

42. HYNES (M.). — Isolation of enteric path. Bact. by means of selectifs media. (*J. of Path. and Bact.* 1942, T. LIV, pp. 193-207.)

43. JORDAN (E.-O.), RUSSEL (H.-L.) et ZEIT (F.-R.). — The longevity of the typhoïd bacillus in water. (1904. *J. of. Inf. Diseases.* T. I, p. 641.)

44. IMBEAUX (Ed.). — Méthodes anglaises d'analyse bactériologique. (*Revue d'Hygiène.* 1940. T. LXI, pp. 640-650.)

45. IMBEAUX (Ed.). — Qualités de l'eau. (1935. Paris. Ed. Dunod, p. 325.)

46. JUDE (A.-L.). — Acquisitions nouvelles dans la technique des coprocultures. (*Revue du Corps de Santé Militaire.* 1947, n° 3, p. 236.)

47. KACZYNSKY. — Züchtung des Typhus bacillen um Wasser. (*Zeitsch. für Hyg. und Infekt. krankh.* 1913, 25 avril. - Reproduit dans *Revue de l'Off. int. d'Hyg. publique.* 1913. T. II, pp. 12-38.)

48. KAUFFMANN. — Die Bakterien der Salmonella Gruppe. (1941. Copenhague. Einar Munskaard.)

49. KAUFFMANN. — Milieu liquide au tétrathionate. (Original.) (*Zentral Blatt für Bakt.* Abt. I. 1930, pp. 113-143.) — Voir de même : (*Zeitsch. für Hyg.* I. 35. T. LXVII, p. 116.)

50. KEHR (R.-W.) et BUTTERFIELD (Chester-T.). — Notes on the relation between Coliforms and Enteric Pathogens. (1943. *Publication de l'U.S. Publ. Health Service.* Ohio.)

51. KNOX (R.), GELL (P.-G.-H.) et POLLOCK (M.-R.). — The selective action of tetrathionate in

bacteriologic media. (*Journal of Hyg.* 1943, septembre, pp. 147-158) et (*J. of Path. and Bact.* 1942, octobre, T. LIV, pp. 469-483.)

52. KOLLE et HETSCH. — Bactériologie expérimentale. (*Edition française,* Paris-Genève, 1910.)

53. KOLMER (J.-A.) et BŒRNER (F.). — Approved Laboratory Technic. (1945. 4 *th. Ed. Appleton Century Comp.* New-York - London.)

54. LECLERC (Edm.). — Eaux potables et eaux résiduaires. (1945 ; Liège. H. Vaillant. Carmanna.)

55. LEHMANN (K.-B.) et NEUMANN (R.-O.). — Bakteriologische Diagnostic. (1889. München ; Ed. franç. par Philibert, J.-B. Baillière et fils, 1913. Paris.)

56. LE MINOR (L.). — La recherche des bacilles typhiques et paratyphiques dans les selles. (*Thèse Méd. Paris.* 1945. N° 186.)

57. LOUREIRO (J.-A. de). — A modification of Wilson and Blair's bismuth sulphite agar. (Stabilized stock solutions.) (1942. *J. of. Hyg.* Vol. XLII. N° 2, pp. 224-226.)

58. LOVREKOVICH (I.). — Bismuth sulfite agar zum Zuchtung der Typh. und Paratyph. Bacillen. (Budapest.) (*Zentral Blatt für Bakt.* 1942. T. CXLII, p. 149.)

59. MARNEFFE (H.). — Analyse bactériologique des eaux. (*Médecine Tropicale.* 1942, décembre. N° 10, pp. 934-941.)

60. MAYFIELD (C.-R.) et GOBER (H.). — Comparative efficience of several media for isolation of enteric pathogens. (*Am. J. of Public Health.* 1940, janvier. T. XXX, pp. 69-76.)

61. METROPOLITAN WATER BOARD LAB. London. — Annual report on the results of bacteriological and chemical anal. of the London Waters. De 1927 à 1937. 22me au 32me rapport.

62. MIHAELHOFF (S.). — Résistance du bacille typhique dans l'eau. (*Annales d'Hygiène.* 1938. T. XVI, pp. 365-374.)

63. MIQUEL. — Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux. (1891, Gauthier Villars, Paris.)

64. MOLLIEX. — Précis d'analyse bactériologique des eaux potables. (1935, Paris).

65. MULLER. — Notes sans titre. (Etudes de milieux). (*C.R. de la Soc. de Biologie de Paris,* 1923. T. LXXXIX, p. 434 et 1925. T. XCIII et 1926 T. XCV).

66. MULLER (O.) — Ueber den Nachweis von Typhusbacillen im Trinkwasser mittels chemischer Fallungs Methoden, insbesondere durch Fallung mit Eisenchlorid. (1905. *Zeitsch. für Hyg.* T. LI p. 1).

67. NETTER et CLARK. — Effectiveness of differents cultures media in isolation of enteric micro-organisms. (*Amer J. of Digest. Diseases.* 1944. July. T. XI, pp. 229-233).

68. OHLMULLER. — Guide pratique pour l'analyse des eaux. (1898, Paris).

69. PINTO (J.) — Méthode de Hoffmann et Ficker améliorée par l'éther de pétrole. (*Bulletin de l'I.P.* 1930. T. XXVIII, N° 6, p. 296).

70. POT (A.W.) — Isolation of Eberthella typhosa (Curaçao). (*J. Of. Path. and Bact.* 1943. T. LV, p. 100).

71. RAVEN (C.), PEDEN (D.) et WRIGHT (H. D.) — Bactériologic examination of supplies. (*J. of Path. and Bact.* 1940. T.L., pp. 287-294).

72. RÉMY. — Procédé nouveau pour isoler le bacille typhique des eaux. (*Annales de l'I.P.* 1901. N° 1, pp. 145-160).

73. *Reports on public Health and medical subjects.* N° 71. The bacteriological examination of water supplies. (1939. Ministry of Health London).

74. RIETSCH. — Sur la séparation du bacille typhique et du coli par la bougie Chamberland. (Procédé Cambier.) (1904. *C.R. de la Soc. de Biologie.* pp. 1106-1108).

75. ROCHAIX (A.) — *Précis d'Hygiène.* (5e Edition du Précis d'Hygiène de Courmont, Lesieur et Rochaix. 1946. Masson. Paris).

76. ROLAND (F.) — Méthodes modernes pour le diagnostic des bactéries intestinales Gram négatives. (*Bulletin médical ;* 1946 ; T. LX, p. 397).

77. ROLAND (F.) — Comparaison de la gélose au vert brillant et de la gélose S.S. (*Assoc. des Microbiologistes de langue française, 2 mars* 1946).

78. ROSENAU. — Preventive Medecine and Hygiene. (1918. New-York-London).

79. ROTH (E.) — Versuche über die Einwirkung des Coffeins auf das Bact. typhi und coli. (1903. *Hyg. Rundschau.* T. XIII, pp. 489-491).

80. ROUX (G.) — *Précis d'analyse microbiologique des eaux* (1892. J.B. Baillère et fils, Paris).

81. RUCHHOFT. — Studies on the longevity of B. typh. in sewage sludge. (*Sewage works Journal.* 1934. Nov. T. VI, p. 1064).

82. RUYS (A. Ch.). — The isolation of typhoïd. bacilli. from water. (*Procedings of the Royal Academie.* Amsterdam, 1936, p. 780).

83. RUYS (A. Ch.) — The isolation of typhoïd and paratyphoid bacteria from. feces and urine. Comparative study of some culture media. (*British Med. Journ.* 1940. T. I., p. 606).

84. RUYS (A. Ch.) — Sur le comportement du bacille typhique dans l'eau de surface. (*Bruxelles Médical,* 1947, N° 13, p. 108).

85. SALINIER. — Dissemination du bacille typhique par les porteurs de germes. (*Thèse Méd. Montpellier,* 1943).

86. SCHEPILEWSKY. — Ueber den Nachweis der Typhusbakterien im Wasser nach der Methode von A. Windelbandt. (*Centralblatt für Bakt.* 1903. T. XLII, pp. 394-400.)

88. SCHUSCHA. — Recherche du bacille typhique dans l'eau. (Nederland Tijdschift voor Geneeskunde. 14 Juil. et 1917, p. 172). Reproduit dans (*Revue de l'Off. Int. d'Hyg. publique*, 1917, a. p. 352).

89. S.D.N. — Institut Cantacuzène. — Précis des maladies infectieuses, 1945, p. 517.

90. SILBERSTEIN. — Use of brillant green in isolation of B. typhosum (*J. of Path. and Bact.* 1935. T. XLI. p. 199).

91. SOHIER, GRÉGOIRE, ROULIN et BETHOUX. — Supériorité du milieu de Kauffmann sur celui de Wilson et Blair. (*Annales de l'I. P.*, 1946. T. LXXII, p. 671).

92. *Standard Methods for examination of water.* Publiées par l'Am. Public Health Association. 8 th. Edition 1936.

Ed. 1945. Eberthella typhosa and other bacillary incitat of enteric diseases. (Marion B. Coleman).

9th Edition 1946. Standard Methods for examination of water.

93. STEWART (A.D.) et GHOSAL (S.C.) — On the value of Wilson and Blair's medium in the isolation of Bact. typh. from river Water. (*Indian J. Med. Research.* 1938. T. XXV. p. 591).

94. SZPER. — Milieu de Kauffmann concentré pour la recherche du bac. typhique dans l'eau. (*C.R.*

de la Soc. de Biologie. 1935. T. CXVIII, p. 1675).

95. Tabet (F.) — Modification of Wilson and Blair's medium. (*J. of Path. and Bact.* 1938. T. XLVI,p. 181).

96. Thiele (H.) et Pehrs (M.) — Critical study of methods of examination of drinking waters. (*Arch. of Hyg.* 1938. T. CXXI, pp. 143-157).

97. Thresh, Beale and Suckling. — The examination of waters and waters supplies. (Fifth Edition by Suckling, 1944. Churchill. London).

98. Thoinot (L. H.) et Masselin (E. S.). — Précis de Microbie. (1902. Masson. Paris p. 340).

99. Tyagaraya. — Simple modification of Wilson and Blair's medium. (*J. of Hyg.* 1940. T. XL. p. 414).

100. Vallet. — Méthode d'isolement du bacille typhique. (*Archives de Médecine expérimentale.* 1901, p. 117).

101. Van Longhem (I.J.) — Etudes faites avec Wilson et Blair sur la fièvre typhoïde aux Pays-Bas et dans les Indes Néerlandaises. (*S.D.N. Conférence des Directeurs d'Instituts d'Hygiène,* 22 et 27 novembre 1927).

102. Vincent (H.) — Présence du bacille typhique dans l'eau de la Seine pendant le mois de juillet

1890. (*Annales de l'I.P.*, 1890, Vol. IV, 25 décembre, p. 1772).

103. VINCENT (H.) — Sur un procédé d'isolement du bacille typhique de l'eau. (*C.R. de la Soc. de Biologie.* 10 février 1890).

104. VIOLLE et FRICKER (J.) — Un nouveau test bactériologique d'évaluation de la qualité de l'eau potable : l'index typhogène. (*C.R. de l'Acad. des Sciences.* 1943. T. 817, p. 327).

105. VOLLENWEIDER (L.) et GRANAZZA (L.). — Supériorité des milieux déshydratés américains. (*C.R. de la Soc. de Biologie.* 1945. Décembre. T. CXXXIX, p. 1120).

106. VOLLENWEIDER (L.) — Techniques modernes de Coproculture. (*Annales de Biologie Clin.* 1946. N° 7, p. 198).

107. WEINBERG (B.), BRUHMANN (E.), GRYANKO (K.) et RADSCHENKO (Anino). — (Odessa). Simple méthode de détection du bacille typhique dans l'eau. (*Reproduit dans la Revue d'Hygiène.* 1938. Janvier. T. LX. pp. 72-80).

108. WILSON (J.) — The isolation of Bact. typh. from infected water. (*Journal of Hygiene.* 1905. T. V. p. 429 et 1922. TXXII, p. 392).

109. WILSON (J.) — Isolation of Bact. typh. by means of bismuth sulf. medium in water born epidemies. (*Journal of Hygiene.* 1938. July. T. XXXVIII, pp. 507-519).

110. WILSON (J.) et BLAIR (E.M.) — Further experience of the bismuth sulfite media in the isolation of B. typh. and B. paratyph. B from faeces, waters and sewage. (*Journal of Hygiene.* Cambridge. 1931. T. XXXI, pp. 138-161).

111. WILSON (W.J.) — Isolation of bact typh. from sewage. (*British Med. Journal.* 1928. Vol. I. p. 1061 et 1933. Vol. 2, p. 560)

112. WYNNE (E.S.) et WILLIAM (O.B.) — Grow of B. typh. and Aerobacter aerogènes in association on tetrathionate broth. (*Journal of Bact.* 1945. T. XLIX, pp. 629-632).

113. ZUNE (A. J.) — Traité d'analyses des eaux potables (1894 ; Lib. Doué, Paris).

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION 9

HISTORIQUE 11

DEFINITIONS ET CLASSIFICATIONS .. 23

ETUDES DES TECHNIQUES 27

I. LES DIFFÉRENTS TEMPS DE LA TECHNIQUE 27

A) *Techn. d'enrichissement* 28

1) Concentration 29

2) Procédés de culture 40

B) *Techn. d'isolement* 55

C) *Techn. d'identification* 69

II. MÉTHODE PROPOSÉE 81

III. OBSTACLES RENCONTRÉS 86

ETUDE PRATIQUE D'UNE EPIDEMIE .. 93

UTILISATION PRATIQUE DE LA RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE 101

CONCLUSION 109

BIBLIOGRAPHIE 111